

## 明 細 書

表皮分化に関与する新規遺伝子、およびその利用

技術分野

[0001] 本発明は、重層上皮で発現する新規分泌タンパク質に関する。

背景技術

[0002] 表皮は高度に角化した典型的な重層扁平上皮であり、これは基底細胞層、有棘細胞層、顆粒細胞層および角化細胞層から構成される。表皮細胞(ケラチノサイト)は基底細胞層から角化細胞層へと上方に移動する。この移動は特徴的な形態変化と同時に、ケラチノサイトの特徴的な分化を伴う。分化の最終ステージでは、ケラチノサイトは細胞内オルガネラを失い、角化層を構成するために扁平形になる。そこで、ケラチノサイト分化の間の遺伝子発現への空間的および時間的な変化パターンが、皮膚病学者だけでなく、細胞生物学者においても興味をひいている(非特許文献1〜3)。例えば、基底膜におけるケラチノサイトは増殖性が高く、基底型のケラチン対(K5/K14)を発現する。ケラチノサイトは基底膜から離れると分化し、K5/K14から基底層上層型の対であるK1/K10までのケラチン発現における変化によって特徴付けられる(非特許文献4〜7)。さらに、その上部の有棘細胞および顆粒細胞層においても、ケラチノサイトは、角化膜(CE)および架橋結合酵素であるトランスグルタミナーゼ(TGase)1などの前駆タンパク質の合成を開始する。角化膜(CE)は角化層ではケラチノサイトのプラズマ膜の細胞質顆粒側で高度な不溶性構造を有し、TGase 1によって架橋結合される様々なタイプのタンパク質から成り立っている(非特許文献8〜11)。

[0003] 表皮のバリアー機能の観点から、CEの構成要素はかなり同定されており、例えばシスタチン、デスモプラキン、エンボプラキン、エラフィン、フィラグリンおよびその他のケラチン類はもちろんのこと、インボルクリン、スモールプロリンリッチタンパク質ファミリーメンバー(SPRRP)およびロリクリンがある(非特許文献11)。さらに、repetin、hornein、periphilinが推定CE前駆タンパク質として同定されている(非特許文献12〜14)。興味深いことに、これらのCE-関連タンパク質の多くは、ヒト染色体1q21(非特許文献15〜17)およびマウス3番染色体(非特許文献18および19)上のいわゆる「Epidermal

defferentiation complex(EDC)」としてクラスター化した遺伝子によってコードされる。しかし、ペリプラキン、sciellin、エンボプラキン、hornein およびperiphilinをコードしているいくつかのCEタンパク質遺伝子はEDCに位置していない(非特許文献20ー22、13、14参照)。EDCは、角化過程の原因となる少なくとも32種の遺伝子からなり、これらの遺伝子はその構造に基づいて3つのグループに分類される(非特許文献23参照)。第1のグループであるインボルクリン、ロリクリンおよびSPRRPはそれぞれ中心領域に短い縦列反復配列を有する(非特許文献24)。第2のグループであるプロフィラグリン、トリコヒアリンおよびrepetinは、融合遺伝子サブグループと呼ばれ、N末端領域にEFハンドドメインを有し、その後に多数の縦列反復配列がある。第3のグループであるS 100ファミリーのメンバーは、EFハンドモチーフをもつ。

[0004] 現在、マウスゲノムと同じくヒトにおける全ての遺伝子が同定され、今後はケラチノサイトの分化における遺伝子発現パターンの空間的および時間的な変化が、ゲノムワイドな方法でより計画的に分析されると考えられる。

最近の分子生物学的および生化学的技術の進歩により、in vivoおよびin vitroにおいて、ヒトケラチノサイト中の多数の遺伝子およびタンパク質の発現を研究することが可能になった。Celisらは、2次元ポリアクリルアミド電気泳動を用い、表皮および培養したケラチノサイト中の多数のタンパク質の発現を明らかにした(非特許文献25)。Katzらは、ケラチノサイト培養液中の分泌タンパク質の部分的カタログを報告した(非特許文献26)。無作為に配列決定したケラチノサイトcDNAライブラリー(非特許文献27および28)、ディファレンシャルディスプレイPCR(非特許文献29ー34)、cDNAマイクロアレイ(非特許文献35ー37)、遺伝子発現の連続分析(非特許文献38および39)並びにシグナル配列トラップ(非特許文献40)は、ケラチノサイトの多くの遺伝子およびタンパク質の発現プロファイルを提供した。

[0005] しかし、皮膚全体をcDNAライブラリーまたは細胞溶解液の調製に使用する場合は、これは、ケラチノサイト、メラニン細胞、繊維芽細胞、皮脂性上皮細胞(sebocyte)、内皮細胞、神経細胞または筋細胞のような異種構造を含み、このことがケラチノサイトそれ自身の遺伝子発現プロファイルの分析を困難にしている。一部の報告において、研究者達は、初代培養したケラチノサイトを使用し、かつこれらを鑑別し、浮遊培養

(raft culture)により重層上皮を形成し、ケラチノサイト自身の情報を得ている(非特許文献41〜45)。しかし、この系においても表皮の個別の層における遺伝子発現情報を得るのは困難である。

- [0006] 非特許文献1:Watt FM著、「Terminal differentiation of epidermal keratinocytes.」、*Curr. Opin. Cell Biol.*、1989年、Vol.1、p.1107-1115
- 非特許文献2:Eckert RL著、「Structure, function and differentiation of the keratinocyte.」、*Physiol. Rev.*、1989年、Vol.69、p.1316-1346
- 非特許文献3:Eckert RL, Crish JF, Robinson NA著、「The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation.」、*Physiol. Rev.*、1997年、Vol.77、p.397-424
- 非特許文献4:Fuchs E, Green H著、「Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte.」、*Cell*、1980年、Vol.19、p.1033-1042
- 非特許文献5:Moll R, Franke WW, Volc-Platzer B, Krepler R著、「Different keratin polypeptides in epidermis and other epithelia of human skin: a specific cytokeratin of molecular weight 46,000 in epithelia of the pilosebaceous tract and basal cell epitheliomas.」、*J Cell Biol*、1982年、Vol.95、p.285-295
- 非特許文献6:Fuchs E and Byrne C著、「The epidermis rising to the surface.」、*Curr. Opin. Genetics Dev.*、1994年、Vol.4、p.725-736
- 非特許文献7:Fuchs E著、「Keratins and the skin.」、*Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*、1995年、Vol.11、p.123-153
- 非特許文献8:Roop, D.著、「Defects in the barrier.」、*Science*、1995年、Vol.267、p.474-475
- 非特許文献9:Ishida-Yamamoto A, Iizuka H著、「Structural organization of cornified cell envelopes and alterations in inherited skin disorders.」、*Exp. Dermatol.*、1998年、Vol.7、p.1-10
- 非特許文献10:Kalinin A, Marekov LN, Steinert PM著、「Assembly of epidermal cornified cell envelope.」、*J. Cell Sci.*、2001年、Vol.114、p.3069-3070
- 非特許文献11:Kalinin AE, Kajava AV, Steinert PM著、「Epithelial barrier function:

assembly and structural features of the cornified cell envelope.」、BioEssays、2002年、Vol.24、p.789-800

非特許文献12:Krieg P, Schuppler M, Koesters R, Mincheva A, Lichter P, and Marks F著、「Repetin (Rptn), a new member of the "fused gene" subgroup within the S100 gene family encoding a murine epidermal differentiation protein.」、Genomics、1997年、Vol.43、p.339-348

非特許文献13:Makino T, Takaishi M, Morohashi M, Huh N著、「Hornein, a novel profilaggrin-like protein and differentiation-specific marker isolated from mouse skin.」、J Biol. Chem.、2001年、Vol.276、p.47445-47452

非特許文献14:Kazerounian S, Aho S著、「Characterization of periphilin, a widespread, highly insoluble nuclear protein and potential constituent of the keratinocyte cornified envelope.」、J. Biol. Chem.、2003年、Vol.278、p.36707-36717

非特許文献15:Volz A, Korge BP, Compton JG, Ziegler A, Steinert PM, Mischke D著、「Physical mapping of a functional cluster of epidermal differentiation genes on chromosome 1q21.」、Genomics、1993年、Vol.18、p.92-99

非特許文献16:Mischke D, Korge BP, Marenholz I, Volz A, Ziegler A著、「Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21.」、J. Invest. Dermatol.、1996年、Vol.106、p.989-992

非特許文献17:Marenholz I, Volz A, Ziegler A, Davies A, Ragoussis I, Korge BP, Mischke D著、「Genetic analysis of the epidermal differentiation complex (EDC) on human chromosome 1q21: chromosomal orientation, new markers, and a 6-Mb YAC contig.」、Genomics、1996年、Vol.37、p.295-302

非特許文献18:Rothnagel JA, Longley MA, Bundman DS, Naylor SL, Lalley PA, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Roop DR著、「Characterization of the mouse loricrin gene: linkage with profilagerin and the flaky tail and soft coat mutant loci on chromosome 3.」、Genomics、1994年、Vol.23、p.450-456

非特許文献19:Song HJ, Poy G, Darwiche N, Lichti U, Kuroki T, Steinert PM,



Kartasova T 著、「Mouse Sprr2 genes: a clustered family of genes showing differential expression in epithelial tissues.」、Genomics、1999年、Vol.55、p.28-42

非特許文献20:Aho S, McLean WHI, Li K, Uitto J 著、「cDNA cloning, mRNA expression, and chromosomal mapping of human and mouse periplakin genes.」、Genomics、1998年、Vol.48、p.242-247

非特許文献21:Champlaud M, Burgeson RE, Jin W, Baden HP, Olson PF 著、「cDNA cloning and characterization of sciellin, a LIM domain protein of the keratinocyte cornified envelope.」、J. Biol. Chem.、1998年、Vol.273、p.31547-31554

非特許文献22:Maata A, Ruhrberg C, Watt F 著、「Structure and regulation of the envoplakin gene.」、J. Biol. Chem.、2000年、Vol.275、p.19857-19865 (左記「Maata」の「a」は、「a」にウムラウトである。)

非特許文献23:Marenholtz I, Zirra M, Fischer DF, Backendorf C, Ziegler A, Mischke D 著、「Identification of human epidermal differentiation complex (EDC)-encoded genes by subtractive hybridization of entire YACs to a gridded keratinocyte cDNA library.」、Genome Research、2001年、Vol.11、p.341-355

非特許文献24:Backendorf C and Hohl D 著、「A common origin for cornified envelope proteins?」、Nat. Genet.、1992年、Vol.2、p.91

非特許文献25:Celis JE, Rasmussen HH, Gromov P ら 著、「The human keratinocyte two-dimensional gel protein database (update 1995).mapping components of signal transduction pathways.」、Electrophoresis、1995年、Vol.16、p.2177-2240

非特許文献26:Katz AB, and Taichman LB 著、「A partial catalogue of proteins secreted by epidermal keratinocytes in culture.」、J. Invest. Dermatol.、1999年、Vol.112、p.818-821

非特許文献27:Konishi K, Morishima Y, Ueda E, Kibe Y, Nonomura K, Yamanishi K, Yasuno H 著、「Cataloging of the genes expressed in human keratinocytes: analysis of 607 randomly isolated cDNA sequences.」、Biochem. Biophys. Res. Commun.、1994年、Vol.202、p.976-983

非特許文献28:Kita H, Okubo K, Matsubara K 著、「an expression profile of active

genes in cultured human keratinocytes.」、DNA Res.、1996年、Vol.3、p.1-7

非特許文献29:Frank S, Werner S著、「The human homologue of the yeast CHL1 gene is a novel keratinocyte growth factor-regulated gene.」、J. Biol. Chem.、1996年、Vol.271、p.24337-24340

非特許文献30:Frank S, Munz B, Werner S著、「The human homologue of a bovine nonselenium glutathione peroxidase is a novel keratinocyte growth factor-regulated gene.」、Oncogene、1997年、Vol.14、p.915-921

非特許文献31:Munz B, Gerke V, Gillitzer R, Werner S著、「Differential expression of the calpain I subunits annexin II and p11 in cultured keratinocytes and during wound repair.」、J. Invest. Dermatol.、1997年、Vol.108、p.307-312

非特許文献32:Rivas MV, Jarvis ED, Morisaki S, Carbonaro H, Gottlieb AB, Krueger JG著、「Identification of aberrantly regulated genes in diseased skin using the cDNA differential display technique」、J. Invest. Dermatol.、1997年、Vol.108、p.188-194

非特許文献33:Rutberg SE, Lee EJ, Hansen LH, Glick AB, Yuspa SH著、「Identification of differentially expressed genes in chemically induced skin tumors.」、Mol. Carcinogen.、1997年、Vol.20、p.80-98

非特許文献34:DiSepio D, Ghosn C, Eckert RL, Deucher A, Robinson N, Duvic M, Chandraratna RAS, Nagpal S著、「Identification and characterization of a retinoid-induced class II tumor suppressor/growth regulatory gene.」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、1998年、Vol.95、p.14811-14815

非特許文献35:Trenkle T, Welsh J, Jung B, Mathieu-Daude F, McClelland M著、「Nonstoichiometric reduced complexity probes for cDNA arrays.」、Nucleic Acids Res.、1998年、Vol.26、p.3883-3891

非特許文献36:Cole J, Tsou R, Wallance K, Gibran N, Isik F著、「Early gene expression profile of human skin to injury using high-density cDNA microarrays.」、Wound Repair and Degeneration、2001年、Vol.9、p.360-370

非特許文献37:Bernard FX, Pedretti N, Rosdy M, Deguercey A著、「Comparison of

gene expression profiles in human keratinocyte mono-layer cultures, reconstituted epidermis and normal human skin; transcriptional effects of retinoid treatments in reconstituted human epidermis.」、Exp. Dermatol.、2002年、Vol.11、p.59-74

非特許文献38:Jansen BJH, Van Ruissen F, De Jongh G, Zeeuwen PLJM, Schalkwijk J著、「Serial analysis of gene expression indifferentiated cultures of human epidermal keratinocytes.」、J. Invest. Dermatol.、2001年、Vol.116、p.12-22

非特許文献39:Ruissen FV, Jansen BJH, deJongh GJ, Zeeuwen PLJM, Schalkwijk J著、「A partial transcriptome of human epidermis」、Genomics、2002年、Vol.79、p.671-678

非特許文献40:Bonkobara M, Das A, Takao J, Cruzjr PD, Ariizumi K著、「Identification of noval genes for secreted and membrane-anchored proteins in human keratinocytes.」、Brit. J. Dermatology、2003年、Vol.148、p.654-664

非特許文献41:Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T著、「Living tissue formed in vivo and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness.」、Science、1981年、Vol.211、p.1052-1054

非特許文献42:Mackenzie IC, Fusenig NE著、「Regeneration of organized epithelial structure.」、J. Invest. Dermatol.、1983年、Vol.81、p.189s-194s

非特許文献43:Asselineau D, Prunieras M著、「Reconstruction of simplified skin: control of fabrication.」、Br.J. Dermatol.、1984年、Vol.111、p.219-222

非特許文献44:Parenteau NL, Nolte CM, Bilbo P, Rosenberg M, Wilkins LM, Johnson EW, Watson S, Mason VS, Bell E著、「Epidermis generated in vitro: practical considerations and applications.」、J Cell Biochem.、1991年、Vol.45、p.245-251

非特許文献45:Stark HJ, Baur M, Breitzkreutz D, Mirancea M, Fusenig NE著、「Organotypic keratinocyte cocultures in defined medium with regular epidermal morphogenesis and differentiation.」、J. Invest. Dermatol.、1999年、Vol.112、p.681-691

発明の開示

## 発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、表皮分化に関与する新規遺伝子の提供を課題とする。

## 課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った。表皮分化にかかわる新規遺伝子を同定する目的で、本発明者らは「ハイスループットin situハイブリダイゼーションシステム(HT-ISH)」と呼ばれる最近確立された遺伝子スクリーニング方法(Komiya T, Tanigawa Y, Hirohashi S: Anal. Biochem. 254:23-30, 1997)をマウス足蹠表皮に対して用いた。この方法は、個々の細胞層を分離することなく、「無傷の」表皮におけるケラチノサイトの個別の層における遺伝子の発現パターンを分析することが可能である。この方法をマウス足底表皮切片に適用することにより、本発明者らは無傷の表皮において層特異的な発現を示す一100個の遺伝子の同定に成功した。その中から、本発明者らは、表皮の有棘層で特異的に発現する分泌ペプチドである1つの新規な遺伝子の2つのスプライシングバリエントであるdermokine- $\alpha$  および- $\beta$  を同定および特長付けした。ゲノムデータベースをこれらの配列に関して検索したところ、その遺伝子が2つの他のケラチノサイトタンパク質である、suprabasin(スプラバシン)(Park GT, Lim SE, Jang S, Morasso MI: J. Biol. Chem. 277:45195-45202, 2002)およびケラチノサイト分化関連タンパク質(Kdap)(Oomizu S, Sahuc F, Asahina K, Inamatsu M, Matsuzaki T, Sasaki M, Obara M, Yoshizato K: Gene. 256:19-27, 2000)をコードするゲノム遺伝子座に位置することが判明した。本発明者らは、suprabasin およびKdapも分泌ペプチドであること、およびdermokine- $\alpha$  / - $\beta$ 、suprabasinおよびKdapが重層上皮において主に発現されることを示した。これらの知見は、SSC(Stratified epithelium secreted peptides complex)と仮に命名された新規な重層上皮関連遺伝子クラスターの存在を明らかにした。

さらに本発明者らは、dermokine- $\alpha$  が、ケラチノサイトに発現させることにより該ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性を有することを見出した。

以上の結果は、dermokine- $\alpha$  / - $\beta$ 、Kdapおよびsuprabasinという4種の分泌タンパク質が、SSCと命名した新規遺伝子複合体を形成し、重層化の開始時に発現され、ケラチノサイトの分化誘導に関与していることを示している。



GeneBank AY444557, AY444558には、dermokine- $\alpha$  / - $\beta$  遺伝子の塩基配列と類似の配列が公開されているが、本明細書に記載のdermokine- $\alpha$  / - $\beta$  遺伝子と塩基配列が異なっており、またその活性も明らかにされていない。

[0009] 本発明は、表皮分化に関与する新規遺伝子、および該遺伝子を含む遺伝子複合体に関し、より具体的には、

[1] 下記(a)～(d)のいずれかに記載のポリヌクレオチド、

(a) 配列番号: 2、4、6または8のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる(を含有する)ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

(b) 配列番号: 1、3、5または7のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド

(c) 配列番号: 2、4、6または8のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ケラチノサイトに発現させることにより該ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

(d) 配列番号: 1、3、5または7のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、ケラチノサイトに発現させることにより該ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

[2] ケラチノサイトの分化または増殖に関与する遺伝子であって、分泌タンパク質をコードする[1]に記載のポリヌクレオチド、

[3] [1]または[2]に記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

[4] [1]または[2]に記載のポリヌクレオチドが挿入されたベクター、

[5] [1]もしくは[2]に記載のポリヌクレオチド、または[4]に記載のベクターを保持する宿主細胞、

[6] [5]に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から、產生させたポリペプチドを回収する工程を含む、[3]に記載のポリペプチドの製造方法、

[7] 共通の遺伝子発現調節下にあることを特徴とする遺伝子複合体であって、(1) Kdap遺伝子、(2) dermokine- $\alpha$  遺伝子、(3) dermokine- $\beta$  遺伝子、および(4)

suprabasin遺伝子の各遺伝子から構成されるケラチノサイトの分化または増殖に関与する遺伝子複合体、

[8] [1]または[2]に記載のポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を持つポリヌクレオチド、

[9] [1]もしくは[2]に記載のポリヌクレオチドまたはその一部に対するアンチセンスポリヌクレオチド、

[10] [3]に記載のポリペプチドに結合する抗体、

[11] dermokine- $\alpha$ タンパク質もしくはdermokine- $\beta$ タンパク質を有効成分として含む、ケラチノサイト分化誘導剤、

[12] 以下の(a)～(d)からなる群より選択される化合物を含む、ケラチノサイト分化抑制剤、

(a) dermokine- $\alpha$  遺伝子もしくはdermokine- $\beta$  遺伝子の転写産物に対するアンチセンス核酸

(b) dermokine- $\alpha$  遺伝子もしくはdermokine- $\beta$  遺伝子の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有する核酸

(c) dermokine- $\alpha$  遺伝子もしくはdermokine- $\beta$  遺伝子の発現を、RNAi効果による阻害作用を有する核酸

(d) dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質と結合する抗体

[13] 以下の工程(a)～(c)を含む、ケラチノサイト分化誘導剤のスクリーニング方法、

(a) dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質を発現する細胞と、被検化合物を接触させる工程

(b) 該細胞におけるdermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質の発現量または活性を測定する工程

(c) 被検化合物を接触させない場合と比較して、前記発現量または活性を上昇させる化合物を選択する工程

[14] 以下の工程(a)～(c)を含む、ケラチノサイト分化抑制剤のスクリーニング方法、

(a) dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質を発現する細胞と、被検化合物を接触させる工程

(b) 該細胞におけるdermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質の発現量または活性を測定する工程

(c) 被検化合物を接触させない場合と比較して、前記発現量または活性を低下させる化合物を選択する工程

[15] 以下の工程(a)ー(c)を含む、ケラチノサイト分化誘導剤のスクリーニング方法、

(a) dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質、またはそれらを発現する細胞と、ケラチノサイト及び被検化合物を共存させる工程

(b) ケラチノサイトの重層上皮細胞への分化を測定する工程

(c) 被検化合物を共存させない場合と比較して、重層上皮細胞への分化を上昇させる化合物を選択する工程

[16] 以下の工程(a)ー(c)を含む、ケラチノサイト分化抑制剤のスクリーニング方法、

(a) dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質、またはそれらを発現する細胞と、ケラチノサイト及び被検化合物を共存させる工程

(b) ケラチノサイトの重層上皮細胞への分化を測定する工程

(c) 被検化合物を共存させない場合と比較して、重層上皮細胞への分化を低下させる化合物を選択する工程

[17] 以下の工程(a)および(b)を含む、被検細胞について、重層上皮から派生した癌細胞か否かを検査する方法、

(a) 被検細胞について、dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質の発現量または活性を測定する工程

(b) 対照と比較して、前記発現量または活性が変化している場合に、被検細胞は重層上皮から派生した癌細胞であるものと判定する工程

[18] 以下の工程(a)および(b)を含む、被検者(被検者由来の試料等)について、扁平上皮癌または基底細胞癌の診断(検査)方法、

(a) 被検者から調製された細胞試料について、[17]に記載の方法により、重層上皮から派生した癌細胞か否かを判定する工程、

(b) 前記工程により、重層上皮から派生した癌細胞であるものと判定された場合に、被検者は、扁平上皮癌または基底細胞癌に罹患しているものと判定する工程

[19] 以下の工程(a)および(b)を含む、被検者について、皮膚疾患の診断(検査)方法、

(a) 被検者から調製された被検試料について、dermokine- $\alpha$ タンパク質もしくはdermokine- $\beta$ タンパク質の発現量または活性を測定する工程

(b) 対照と比較して、前記発現量または活性が変化している場合に、被検者は皮膚疾患に罹患しているものと判定する工程

[20] 皮膚疾患が乾皮症、乾癬、または魚鱗癬である、[19]に記載の診断(検査)方法、

[21] dermokine- $\alpha$ タンパク質もしくはdermokine- $\beta$ タンパク質を投与する工程を含む、ケラチノサイト分化誘導低下に起因する疾患の治療方法、

[22] [13]または[15]に記載のスクリーニング方法によって得られるケラチノサイト分化誘導剤を投与する工程を含む、ケラチノサイト分化誘導低下に起因する疾患の治療方法、

[23] 以下の(a)ー(d)からなる群より選択される化合物を投与する工程を含む、ケラチノサイト分化亢進に起因する疾患の治療方法、

(a) dermokine- $\alpha$ 遺伝子もしくはdermokine- $\beta$ 遺伝子の転写産物に対するアンチセンス核酸

(b) dermokine- $\alpha$ 遺伝子もしくはdermokine- $\beta$ 遺伝子の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有する核酸

(c) dermokine- $\alpha$ 遺伝子もしくはdermokine- $\beta$ 遺伝子の発現を、RNAi効果による阻害作用を有する核酸

(d) dermokine- $\alpha$ タンパク質もしくはdermokine- $\beta$ タンパク質と結合する抗体

[24] [14]または[16]に記載のスクリーニング方法によって得られるケラチノサイト分化抑制剤を投与する工程を含む、ケラチノサイト分化亢進に起因する疾患の治療



方法、

[25] ケラチノサイト分化誘導低下に起因する疾患が、尋常性乾癬あるいは日光角化症である、[21]または[22]に記載の治療方法、

[26] ケラチノサイト分化亢進に起因する疾患が、過角化を伴う尋常性魚鱗癬、伴性遺伝性魚鱗癬、尋常性疣贅、アミロイド苔癬及び顆粒層肥厚を伴う扁平苔癬、あるいは水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症である、[23]または[24]に記載の治療方法、

[27] dermokine- $\alpha$ タンパク質もしくはdermokine- $\beta$ タンパク質の、ケラチノサイト分化誘導低下に起因する疾患の治療剤の製造における使用、

[28] [13]または[15]に記載のスクリーニング方法によって得られるケラチノサイト分化誘導剤の、ケラチノサイト分化誘導低下に起因する疾患の治療剤の製造における使用、

[29] 以下の(a)ー(d)からなる群より選択される化合物の、ケラチノサイト分化亢進に起因する疾患の治療剤の製造における使用、

(a) dermokine- $\alpha$ 遺伝子もしくはdermokine- $\beta$ 遺伝子の転写産物に対するアンチセンス核酸

(b) dermokine- $\alpha$ 遺伝子もしくはdermokine- $\beta$ 遺伝子の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有する核酸

(c) dermokine- $\alpha$ 遺伝子もしくはdermokine- $\beta$ 遺伝子の発現を、RNAi効果による阻害作用を有する核酸

(d) dermokine- $\alpha$ タンパク質もしくはdermokine- $\beta$ タンパク質と結合する抗体

[30] [14]または[16]に記載のスクリーニング方法によって得られるケラチノサイト分化抑制剤の、ケラチノサイト分化亢進に起因する疾患の治療剤の製造における使用、

[31] ケラチノサイト分化誘導低下に起因する疾患が、尋常性乾癬あるいは日光角化症である、[27]または[28]に記載の製造における使用、

[32] ケラチノサイト分化亢進に起因する疾患が、過角化を伴う尋常性魚鱗癬、伴性遺伝性魚鱗癬、尋常性疣贅、アミロイド苔癬及び顆粒層肥厚を伴う扁平苔癬、あるいは水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症である、[29]または[30]に記載の製造における

使用、  
を提供するものである。

### 図面の簡単な説明

[0010] [図1]ハイスループットin situハイブリダイゼーション(HT-ISH)の結果を示す図および写真である。A, 均等化したマウス背中皮膚cDNAライブラリーの評価した結果を示す。開始ライブラリー(E0)および均等化ライブラリー(E1およびE2)は重複して定量的リアルタイムPCR解析によって分析した。全データは内部標準であるロリクリンについて標準化した。E0と比較して、E2では、ケラチン14およびケラチン5の両方のcDNA(豊富なcDNA)がそれぞれ約1/5量にまで減少した。しかしインテグリン $\alpha$ -M(希少なcDNA)は約42倍量に増加した。B, HT-ISHシグナルの例を示す写真である。均等化したcDNAライブラリー(E2)より調製したcRNAプローブが、96ウェルフォーマットにおける成体マウス足蹠表皮の切片にハイブリダイズした。シクロフィリンA(NM008907)は基底層および基底層上に特異的に発現した(a)。Kdapは基底上細胞層において検出された(b)。プロチモシン $\alpha$ (NM008972)(c)、ジアゼパム結合インヒビター(BC028874)(d)、チューブリン $\beta$ -2鎖類似遺伝子(XM130158)(e)、ラミンA(BC015302)(f)、核分布Cホモログ(NM010948)(g)、デスモプラキンI(XM138593)(h)、ケラチン関連タンパク質16-5(NM130857)(i)、およびヌクレオシド二リン酸キナーゼC(AF288691)(j)は有棘層および顆粒層で検出された(k)。ロリクリン(U09189)mRNAはもっぱら顆粒層においてのみ検出された(l)。特異的なシグナルは、各クローンに対するセンスプローブで検出されなかった(データ示さず)。ダッシュ線は、表皮および真皮の間の境界を表わしている。スケールバー; 50  $\mu$  m。

[図2-AB]dermokine- $\alpha$  および  $\beta$  の同定を示す図および写真である。A, 成体マウス足蹠表皮の切片についてSK063F08プローブでのHT-ISHシグナルを示す写真である。アンチセンスSK063F08プローブ(Antisense)は、表皮の有棘層から強烈なシグナルを与えたが、センスプローブ(Sense)ではシグナルは検出されなかった。H+Eはヘマトキシリン-エオジン染色画像である。ダッシュ線は、表皮および真皮の間の境界を表わしている。スケールバー; 50  $\mu$  m。B, SK063F08配列を有するマウスESTおよびそれらのヒトホモログESTを示す図である。SK063F08の全長配列を有するマウスEST、

および3'-末端領域でAK003695と同じ配列をシェアした(AK003695では98-661 bp およびAK081753では1505-2064 bp) マウスEST(AK081753)は、これらのESTがスプライシングバリエーションであることを示唆している。AK003695およびAK081753のヒトホモログは、それぞれ2つのEST、AL832080およびBC035311として発見された。ORFは四角で示した。 $\beta$  プローブはノーザンブロットイングおよびin situハイブリダイゼーションに使用した(図5および6参照)。1個のヌクレオチドの挿入(グアニン)がAK081753配列の743位において発見された。また、1132bpと1133bpの間に27bpの挿入、1197-1244bpの欠失が確認された。

[図2-C]dermokine- $\alpha$  および $\beta$  の同定を示す図である。AK003695/AL832080およびAK081753/BC035311の各ESTから推測されるマウスおよびヒトdermokine- $\alpha$  および $\beta$  のアミノ酸配列を示す。SignalP serverにより予想された推定シグナル配列に下線を付け、dermokine- $\alpha$  と $\beta$  の間の同一領域は、四角で囲んだ。dermokine- $\beta$  のグリシンおよびセリン-リッチドメインは、ダッシュ線で示した。dermokine- $\alpha$  およびdermokine- $\beta$  の配列データは、GenBankに、各々、マウスにおいてはアクセッション番号AK003695およびAK081753にて、ヒトにおいてはアクセッション番号AL832080およびBC035311にて登録されている。

[図3-A]dermokine- $\alpha$  および $\beta$  遺伝子の構造を示す図である。染色体19q131上のヒトdermokine- $\alpha$  および $\beta$  遺伝子のエキソンを示す。白ボックスおよび黒ボックスは、それぞれmRNAのコード領域および非コード領域をコードしているエキソンを表わしている。推定翻訳開始および終止部位はそれぞれATGおよびTGAで示した。dermokine- $\alpha$  のエキソン2-6は、エキソン12-16としてdermokine- $\beta$  によって利用され、COOH-末端配列および3'-非コード領域と同一であった。

[図3-B]dermokine- $\alpha$  および $\beta$  遺伝子の構造を示す図である。suprabasin、demokine- $\alpha$  /- $\beta$  およびケラチノサイト分化関連タンパク質(Kdap)に対する遺伝子を有する、マウスおよびヒト遺伝子座を示す。矢印は、転写方向を示している。精巢特異的GAPDH、精巢特異的グリセルアルデヒド3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ遺伝子; GPR43、Gタンパク質共役型受容体43遺伝子。

[図4-A]ヒトdermokine- $\alpha$  /- $\beta$ 、Kdapおよびsuprabasin (0.7-kb転写産物)のN末端で

の推定シグナルペプチドの概略図を示す図である。矢頭は、予測された切断部位を表す。pI値は含有されたアミノ酸残基から計算した。dermokine- $\alpha$  および対応する dermokine- $\beta$  のC末端領域の推定分泌フォームが、かなり高いpI値 (pI=10.3)を示したことは特筆すべきである。

[図4-BC]dermokine- $\alpha$  /- $\beta$ 、Kdapおよびsuprabasinの分泌を解析した結果を示す写真である。B, 293/EBNA-1細胞における、4種のSEAP(His)<sub>6</sub> 融合タンパク質である、dermokine- $\alpha$ -SEAP(His)<sub>6</sub>、dermokine- $\beta$ -SEAP(His)<sub>6</sub>、Kdap-SEAP(His)<sub>6</sub>、およびsuprabasin-SEAP(His)<sub>6</sub>を表す写真である。dermokine- $\alpha$ 、- $\beta$ 、Kdapおよびsuprabasinは、(His)<sub>6</sub> C-末端タグとともにそれ自身のシグナルペプチドを欠いている分泌アルカリ性ホスファターゼ (SEAP) のN末端へ融合した。dermokine- $\alpha$ 、- $\beta$ 、Kdapおよびsuprabasin (またコントロールとしてSEAP(His)<sub>6</sub>) の推定シグナル配列を運ぶこれらの融合タンパク質を、293/EBNA-1細胞において一過性に発現させた。培養培地 (各レーンに10  $\mu$  g) (Medium)は、SDS-PAGEにより分離し、かつ抗-His抗体によりイムノブロッティングを施した。培地に分泌された融合タンパク質は、矢頭で示した。4種の融合タンパク質の全ては、培地中に分泌された。分泌されたKdap-SEAP(His)<sub>6</sub>が高い分子量 (アスタリスク) のバンドで検出された。C, 培養培地から精製したdermokine- $\alpha$ -SEAP(His)<sub>6</sub>、dermokine- $\beta$ -SEAP(His)<sub>6</sub>、Kdap-SEAP(His)<sub>6</sub>、およびsuprabasin-SEAP(His)<sub>6</sub>の写真である。分泌融合タンパク質を含む293/EBNA-1細胞の培養培地を回収し、融合タンパク質をTALON金属アフィニティーレジンによって精製した。精製したタンパク質 (矢印) をSDS-PAGEにより分解し、引き続きクーマシーブリリアントブルー染色し、N末端アミノ酸配列を解析した。分泌されたdermokine- $\alpha$ -SEAP(His)<sub>6</sub>、dermokine- $\beta$ -SEAP(His)<sub>6</sub>、Kdap-SEAP(His)<sub>6</sub>、およびsuprabasin-SEAP(His)<sub>6</sub>のN末端アミノ酸配列は、Aにおいて予測されたように、それぞれWGADA、GPLQS、ATLGG、およびASDDPとして検出された。

[図5]組織におけるdermokine- $\alpha$  /- $\beta$ 、Kdap、およびsuprabasinの発現パターンを示す写真である。A. ノーザンブロッティングの結果を示す写真である。マウス組織からの総RNA (20  $\mu$  g) をプロットしたナイロン膜を、各遺伝子に特異的なDIG-標識したcRNA断片でプロービングした。dermokine- $\alpha$  (矢頭) および対応するdermokine- $\beta$  (



矢印)のC末端領域の両方にハイブリダイズするSK063F08プローブは2つのバンド(Dermokine- $\alpha$  / - $\beta$ )を形成したが、dermokine- $\beta$ の特異的にハイブリダイズする $\beta$ プローブは1つのバンド(Dermokine- $\beta$ )だけ形成した(図2B参照)。メンブレンは、Kdap特異的プローブ(Kdap)、suprabasin特異的プローブ(Suprabasin)およびコントロールGAPDH特異的プローブとハイブリダイズした。全ての遺伝子は皮膚に多く発現し、少ないながらも胃でも発現していた。Kdapはまた肺でも検出された。B, 表皮でのdermokine- $\alpha$ 、- $\beta$ 、Kdap、およびsuprabasinの発現パターンを示す写真である。マウス足蹠表皮の連続切片は、dermokine- $\beta$  (SK063F08; Dermokine- $\alpha$  / - $\beta$ )、dermokine- $\beta$  ( $\beta$  プローブ; Dermokine- $\beta$ )、Kdap (Kdap) およびsuprabasinのdermokine- $\alpha$  / C末端領域に対して特異的なアンチセンス(Antisense)およびセンス(Sense)プローブとハイブリダイズした。センスプローブとハイブリダイズした切片のヘマトキシリン-エオジン染色を示した(H+E)。dermokine- $\alpha$  / - $\beta$ 、dermokine- $\beta$  およびsuprabasin特異的ハイブリダイゼーションシグナルが、等しくマウス足蹠表皮の有棘層において検出された。しかし、Kdap特異的シグナルは有棘層の基底上領域に局限していた。センスプローブとハイブリダイズする切片に特異的なシグナルは検出されなかった。ダッシュ線は表皮および真皮の間の境界を示す。スケールバー; 50  $\mu$  m。

[図6-A]SSC産物の写真である。マウス胚発生の中のdermokine- $\alpha$  / - $\beta$ の発現を示す写真である。マウス胚の全ステージのブロット(Seegene)はDIG-標識されたSK063F08のcRNA断片でプローブした。dermokine- $\beta$  (矢印)はE15.5で発現を始めた。Dermokine- $\alpha$  (矢頭)はまずE16で現れ、E17.5までその発現が増加し、その後E18.5までに減少した。下段パネルはエチジウムブロマイド染色メンブレンである。

[図6-B]初代培養ヒトケラチノサイトのin vitro分化を示す図である。ヒト初代ケラチノサイトは、異なる $\text{Ca}^{2+}$ 濃度下(0.15mM  $\text{Ca}^{2+}$  および1.50mM  $\text{Ca}^{2+}$ )2日間(2 days)で培養した、並びに0.15mM  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度(0.15mM  $\text{Ca}^{2+}$ )下異なる細胞密度(2 days、4 days、および6 days)で培養した。分化は $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の増加(0.15mMから1.50mM)あるいは0.15mM  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度での細胞密度の減少(2-dayから6-day)によって誘導された。総RNAはこれらの細胞から調製し、かつSYBR Green-ベースのqRT-PCR解析を、

dermokine- $\alpha$ 、 $-\beta$ 、Kdap、suprabasinおよび分化特異的遺伝子(ケラチン10、インボルクリン、ロリクリンおよびトランスグルタミナーゼ1)について特異的プライマーおよびコントロール $\beta$ アクチン遺伝子で行った。全データは内部GAPDH mRNAコントロールについて標準化した。分化特異的遺伝子に同じく、dermokine- $\alpha$ 、 $-\beta$ 、Kdap、およびsuprabasin遺伝子は分化が誘導されると有意に上方調節された。コントロール $\beta$ アクチン遺伝子の転写は誘導されなかった。バーは、2連して行われた3回の個別の実験の標準偏差を表わしている。

[図7]Dermokine- $\alpha$ がケラチノサイトの分化に及ぼす影響について示す図である。A、12 wellからのtotal RNAの収量について示すグラフである。12 wellに2500 cells/cm<sup>2</sup>で培養したケラチノサイトに対して、TransIT LT1 kartinocyteを用いてpcDNA-human Dermokine- $\alpha$ -HAを発現させた。MockとしてはpcDNA3.1のみを用いた。Total RNAを抽出したところ、human Dermokine- $\alpha$ -HAを発現させたケラチノサイトでは有意にtotal RNAの回収量が減少した。B、インボルクリン(Involucrin)の発現について示すグラフである。Aで調製した、total RNAから、qRT-PCRをインボルクリンのmRNAに対して行った。Dermokine- $\alpha$ を発現させると、有意にインボルクリンのmRNAが増加した。

[図8-AB]SSCタンパク質群に対する抗体を作成したことを示す図および写真である。A、抗原を作成するために用いられたConstructの図である。dermokine- $\beta$ - $\Delta$ Cはdermokine- $\beta$ におけるdermokine- $\alpha$ との共通部分を欠失したものでdermokine- $\beta$ に特異的な抗体を作成するために用いられた。B、抗原に用いたタンパク質を示す写真である。抗原には、293/EBNA-1細胞へ一過性に発現させた、dermokine- $\alpha$ 、dermokine- $\beta$ - $\Delta$ C、Kdap、SuprabasinのSEAP(His)<sub>6</sub>との融合タンパク質をそれぞれ用いた。図はCBB染色像である。

[図8-C]SSCタンパク質群に対する抗体を作成したことを示す写真である。SSCタンパク質群に対する抗血清を用いたimmunoblotを示す写真である。293/EBNA-1細胞にdermokine- $\alpha$ 、 $-\beta$ 、 $-\beta$ - $\Delta$ C、Kdap、Suprabasinをそれぞれ一過性に発現させて、培養上清を調製した。それらを電気泳動後、ニトロセルロース膜へトランスファーし、各タンパク質に対する抗血清でimmunoblotした。培養上清のCBB染色像も併に示し

た。dermokine- $\alpha$  に対する抗体は、dermokine- $\beta$ - $\Delta$ Cには反応していない。

[図9]293細胞で発現させたヒト及びマウスdermokine- $\beta$ - $\Delta$ CをCBB(クーマシーブリリアントブルー)およびimmunoblotにより解析した結果を示す写真である。中央より右側がマウス、左側がヒトの結果である。

[図10]ヒト/マウスdermokine- $\beta$ -SEAP(His)<sub>6</sub>もしくはdermokine- $\beta$ - $\Delta$ C-SEAP(His)<sub>6</sub>のアルカリフォスファターゼ活性を検出した結果を示すグラフである。Aがマウス、Bがヒトの結果である。

[図11]pcDNA3.1-human dermokine- $\beta$ 、pcDNA3.1-human dermokine- $\beta$ - $\Delta$ Cを293/EBNA-1細胞にtransfectionしSDS-PAGEした後のゲルを硝酸銀染色した結果、およびAnti-hDK mAbによるimmunoblotの結果を示す写真である。

### 発明を実施するための最良の形態

- [0011] 本発明は、基底層上層の分化した表皮層で発現する新規分泌タンパク質、および該タンパク質をコードするポリヌクレオチドに関する。本発明のタンパク質は、ケラチノサイトの分化および／または増殖に関与するものと考えられる。
- [0012] 本発明の同定された2種の新規タンパク質は、本発明者らによって「dermokine- $\alpha$ 」、および「dermokine- $\beta$ 」と命名された。マウスdermokine- $\alpha$  遺伝子の塩基配列を配列番号:1に、該遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号:2に記載する。また、マウスdermokine- $\beta$  遺伝子の塩基配列を配列番号:3に、該遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号:4に記載する。また、ヒトdermokine- $\alpha$  遺伝子の塩基配列を配列番号:5に、該遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号:6に記載する。さらに、ヒトdermokine- $\beta$  遺伝子の塩基配列を配列番号:7に、該遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号:8に記載する。
- [0013] 本発明はまず、下記(a)～(d)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを提供する。
- (a) 配列番号:2、4、6または8のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド
- (b) 配列番号:1、3、5または7のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド

(c) 配列番号: 2、4、6または8に記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

(d) 配列番号: 1、3、5または7に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド

[0014] 本発明の好ましい態様においては、上記(c)または(d)は、以下のポリヌクレオチドである。

(c) 配列番号: 2、4、6または8のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ケラチノサイトに発現させることにより該ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

(d) 配列番号: 1、3、5または7のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、ケラチノサイトに発現させることにより該ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

[0015] 当業者においては、任意のポリペプチドに対し、上記(c)または(d)の「ケラチノサイトに発現させることにより該ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性」を有するか否かについて、適宜、判定を行うことができる。例えば、被検ポリペプチドをケラチノサイトへ導入し、重層上皮の分化マーカー、好ましくはインボルクリンの発現を指標として、判定することができる。例えば、上記インボルクリンの発現が上昇する場合、被検ポリペプチドは、「ケラチノサイトに発現させることにより該ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性」を有するものと判定される。

さらに、本発明の好ましい態様においては、ケラチノサイトの分化および／または増殖に関与する遺伝子であって、分泌タンパク質をコードする上記(a)～(d)のいずれかに記載のポリヌクレオチドである。

[0016] 本発明の好ましい態様においては、上記マウスもしくはヒトにおけるdermokine- $\alpha$ タンパク質およびdermokine- $\beta$ タンパク質、ならびに該タンパク質の改変体(変異体)を提供する。



より詳しくは、配列番号:2、4、6、または8のいずれかに記載のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、並びに、該アミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、dermokine- $\alpha$ タンパク質またはdermokine- $\beta$ タンパク質と機能的に同等なポリペプチドを提供する。

[0017] 本発明は、本発明者らにより同定されたポリペプチド、および該ポリペプチドと機能的に同等なポリペプチド、並びに、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。ここで「機能的に同等」とは、対象となるポリペプチドが本発明者らにより同定されたポリペプチド(例えば、配列番号:2、4、6または8に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド)と同等の生物学的機能(活性)を有していることを意味する。

本発明のポリヌクレオチドが持つ生物学的機能(活性)としては、例えば、基底層上層の分化した表皮層で発現すること、または、ケラチノサイトの分化および／または増殖に関与すること等を挙げることができる。例えば、ケラチノサイトの分化誘導活性を挙げることができる。さらに例示すれば、重層上皮特異的に発現する機能、マウス発生初期のin vivoにおける表皮重層化を担う機能等を挙げることができる。これら以外にも本発明にdermokine- $\alpha$ ／- $\beta$ に関して、後述の実施例に記載された機能(活性)を挙げることができる。

[0018] 従って本発明には、配列番号:2、4、6または8のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、基底層上層の分化した表皮層で発現する、または、ケラチノサイトの分化および／または増殖に関与するタンパク質をコードするポリヌクレオチドが含まれる。さらに、配列番号:1、3、5または7のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、基底層上層の分化した表皮層で発現する、または、ケラチノサイトの分化および／または増殖に関与するタンパク質をコードするポリヌクレオチドも本発明に含まれる。また、本発明のこれらポリヌクレオチドは、分泌タンパク質であることが好ましい。

[0019] 被検ポリペプチド(タンパク質)について、分泌タンパク質であるか否かは、当業者においては、公知の方法により評価することができる。例えば、被検タンパク質へ

SEAP(secreted alkaline phosphatase)(His)<sub>6</sub> タグを付けた融合タンパク質を発現するベクターを作製し、該ベクターを細胞へトランスフェクションする。抗His抗体によるイムノブロッティングによって、該細胞培地へ被検タンパク質が分泌されるか否かを検討することができる。より詳細には、後述の実施例に記載の方法によって実施することができる。

[0020] また、被検ポリペプチド(被検遺伝子)が基底層上層の分化した表皮層で発現しているか否かは、当業者においては、公知の方法、例えば、ノーザンブロット法、ウェスタンブロット法、またはin situハイブリダイゼーション法等により適宜、実施することができる。また、被検ポリペプチド(被検遺伝子)が、ケラチノサイトに分化および／または増殖に関与しているか否かは、例えば、高Ca<sup>2+</sup>濃度または高細胞密度の条件下における被検ポリペプチド(遺伝子)の発現解析によって、検討することができる。より詳細には、重層上皮分化マーカーを用いてqRT-PCRによりその発現量を検討することによって確認することができる。より具体的には、後述の実施例に記載の方法によって適宜、実施することができる。

[0021] 本発明の上記ポリヌクレオチドは、当業者においては、一般的に公知の方法により単離することが可能である。例えば、ハイブリダイゼーション技術(Southern, EM., J Mol Biol, 1975, 98, 503.)やポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術(Saiki, RK. et al., Science, 1985, 230, 1350., Saiki, RK. et al., Science 1988, 239, 487.)を利用する方法が挙げられる。すなわち、配列番号:1、3、5または7のいずれかに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドもしくはその一部をプローブとして、また配列番号:1、3、5または7のいずれかに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、所望の動物から配列番号:1、3、5または7のいずれかに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドと高い相同性を有するポリヌクレオチドを単離することは、当業者にとって通常行い得ることである。このように、ハイブリダイゼーション技術やPCR技術によって単離し得る、配列番号:1、3、5または7のいずれかに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドもまた本発明のポリヌクレオチドに含まれる。このようなポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号:1、3、5または7に示される塩基配列からなる遺伝子

の、マウスまたはヒト以外の生物におけるホモログ等を挙げることができる。

[0022] 上記ポリヌクレオチドを単離するためには、好ましくはストリンジেন্টな条件下でハイブリダイゼーション反応を行う。本発明においてストリンジেন্টなハイブリダイゼーション条件とは、6M 尿素、0.4% SDS、0.5×SSCの条件またはこれと同等のストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件を指す。よりストリンジエンシーの高い条件、例えば、6M 尿素、0.4% SDS、0.1×SSCの条件下では、より相同性の高いポリヌクレオチドを単離できることが期待される。こうして単離されたポリヌクレオチドは、アミノ酸レベルにおいて、配列番号：2、4、6または8に記載のアミノ酸配列と高い相同性を有すると考えられる。高い相同性とは、アミノ酸配列全体で少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の配列の同一性を指す。

[0023] アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、カーリンおよびアルチュールによるアルゴリズムBLAST (Proc. Natl. Acad. Sei. USA, 1990, 87, 2264-2268., Karlin, S. & Altschul, SF., Proc. Natl. Acad. Sei. USA, 1993, 90, 5873.)を用いて決定できる。BLASTのアルゴリズムに基づいたBLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul, SF. et al., J Mol Biol, 1990, 215, 403.)。BLASTNを用いて塩基配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=100、wordlength=12とする。また、BLASTXを用いてアミノ酸配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

[0024] 本発明のポリヌクレオチドには、ゲノムDNA、cDNAおよび化学合成DNAが含まれる。ゲノムDNAおよびcDNAの調製は、当業者にとって常套手段により行うことが可能である。ゲノムDNAは、例えば、本発明のポリヌクレオチド (例えば、配列番号：1、3、5または7に記載の塩基配列) を有する生物からゲノムDNAを抽出し、ゲノミックライブラリー (ベクターとしては、例えば、プラスミド、ファージ、コスミド、BAC、PACなどが利用できる) を作製し、これを展開して、本発明のポリヌクレオチドを基に調製したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションあるいはプラークハイブリダイゼーションを行

うことで調製できる。また、本発明のポリヌクレオチド(例えば、配列番号:1、3、5または7)に特異的なプライマーを作製し、これを利用したPCRを行って調製することも可能である。cDNAは、例えば、本発明のポリヌクレオチドを有する生物から抽出したmRNAを基にcDNAを合成し、これをλ ZAPなどのベクターに挿入してcDNAライブラリーを作製し、これを展開して、上記と同様にコロニーハイブリダイゼーションあるいはブランクハイブリダイゼーションを行うことで、またPCRを行うことにより調製できる。

[0025] また、本発明は、配列番号:2、4、6または8のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と構造的に類似しているタンパク質をコードするポリヌクレオチドも提供する。このようなポリヌクレオチドとしては、該タンパク質において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。上記タンパク質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、その機能が保持される限り制限はない。変異数は、典型的には、全アミノ酸の10%以内であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の1%以内であると考えられる。より具体的には、アミノ酸の変異数は、通常50アミノ酸以内であり、好ましくは30アミノ酸以内であり、より好ましくは10アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内であり、最も好ましくは3アミノ酸以内である。

[0026] また本発明は、配列番号:2、4、6または8のいずれかに記載のアミノ酸配列と相同性(ホモロジー)を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、上述の機能(活性)を有するポリペプチドを提供する。この「相同性(ホモロジー)」は、該ポリペプチドが上述の機能(活性)を有する限り、その高さは特に制限されないが、通常、60%以上の相同性を有し、好ましくは70%以上の相同性を有し、より好ましくは80%以上の相同性を有し、さらに好ましくは85%以上の相同性を有し、さらに好ましくは90%以上の相同性を有し、最も好ましくは95%以上の相同性を有する。

[0027] 上記ポリヌクレオチドを調製するために、当業者によく知られた方法としては、上記したハイブリダイゼーション技術やポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術の他に、例えば、該ポリヌクレオチドに対し、site-directed mutagenesis法(Kramer, W. & Fritz, HJ., Methods Enzymol, 1987, 154, 350.)により変異を導入する方法が挙げられる。また、



自然界においても、塩基配列の変異によりコードするタンパク質のアミノ酸配列が変異することは起こり得ることである。また、塩基配列が変異していても、その変異がタンパク質中のアミノ酸の変異を伴わない場合(縮重変異)があり、このような縮重変異ポリヌクレオチドも本発明に含まれる。

[0028] 本発明は、また、本発明のポリペプチドの断片を提供する。こうした断片は全体的に前記本発明のポリペプチドのアミノ酸配列の一部と同一であるが、全部とは同一でないアミノ酸配列を有するポリペプチドである。本発明のポリペプチド断片は、通常、8アミノ酸残基以上、好ましくは12アミノ酸残基以上(例えば、15アミノ酸残基以上)の配列からなるポリペプチド断片である。好適な断片としては、例えば、アミノ末端を含む一連の残基もしくはカルボキシル末端を含む一連の残基の欠失、またはアミノ末端を含む一連の残基とカルボキシル末端を含む一連の残基の二連の残基の欠失したアミノ酸配列を有するトランケーション(truncation)ポリペプチドが含まれる。また、 $\alpha$ ヘリックスと $\alpha$ ヘリックス形成領域、 $\beta$ シートと $\beta$ シート形成領域、ターンとターン形成領域、コイルとコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、 $\alpha$ 両親媒性領域、 $\beta$ 両親媒性領域、可変性領域、表面形成領域、基質結合領域、および高抗原指数領域を含む断片のような、構造的または機能的特性により特徴づけられる断片も好適である。特定された配列および断片の変異型も本発明の一部を構成する。好適な変異型は、同類アミノ酸の置換を伴うものである。即ち、ある残基が同様の性質の他の残基で置換されているものである。典型的なこうした置換は、例えば、Ala, Val, LeuとIleの間、SerとThrの間、酸性残基 AspとGluの間、AsnとGlnの間、塩基性残基 LysとArgの間、または芳香族残基 PheとTyrの間で起こる。

[0029] 本発明において置換されるアミノ酸は、タンパク質の機能の保持の観点から、置換前のアミノ酸と似た性質を有するアミノ酸であることが好ましい。例えば、Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trpは、共に非極性アミノ酸に分類されるため、互いに似た性質を有すると考えられる。また、非荷電性としては、Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glnが挙げられる。また、酸性アミノ酸としては、AspおよびGluが、塩基性アミノ酸としては、Lys, Arg, Hisが挙げられる。従って、本発明において改変に供するアミノ酸の種類は特に制限されないが、改変の前後のアミノ酸が、上記のように似た性質に分



類されるアミノ酸同士であることが好ましい。

また、本発明の上記ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドもまた本発明に含まれる。

[0030] 本発明は、本発明のポリヌクレオチドが挿入されたベクター、本発明のポリヌクレオチドまたは該ベクターを保持する宿主細胞、および該宿主細胞を利用した本発明のポリペプチドの製造方法を提供する。

本発明のベクターとしては、挿入したDNAを安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしてはpBluescriptベクター(Stratagene社製)などが好ましい。本発明のポリペプチドを生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内でポリペプチドを発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であればpBESTベクター(プロメガ社製)、大腸菌であればpETベクター(Invitrogen社製)、培養細胞であればpME18S-FL3ベクター(GenBank Accession No. AB009864)、生物個体であればpME18Sベクター(Mol Cell Biol. 8:466-472(1988))などが好ましい。ベクターへの本発明のDNAの挿入は、常法により、例えば、制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11)。

[0031] 本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。ポリペプチドを発現させるための細胞としては、例えば、細菌細胞(例:ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌)、真菌細胞(例:酵母、アスペルギルス)、昆虫細胞(例:ドロソフィラS2、スポドプテラSF9)、動物細胞(例:CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowesメラノーマ細胞)および植物細胞を例示することができる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法(GIBCO-BRL社製)、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。

- [0032] 宿主細胞において発現したポリペプチドを小胞体の内腔に、細胞周辺腔に、または細胞外の環境に分泌させるために、適当な分泌シグナルを目的のポリペプチドに組み込むことができる。これらのシグナルは目的のポリペプチドに対して内因性であっても、異種シグナルであってもよい。
- [0033] 本発明のポリペプチドの回収は、本発明のポリペプチドが培地に分泌される場合は、培地を回収する。本発明のポリペプチドが細胞内に産生される場合は、その細胞をまず溶解し、その後にポリペプチドを回収する。
- 組換え細胞培養物から本発明のポリペプチドを回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法を用いることができる。
- [0034] また本発明者らは、本発明のdermokine- $\alpha$  遺伝子およびdermokine- $\beta$  遺伝子が、ケラチノサイト分化関連タンパク質(Kdap)をコードする遺伝子、およびsuprabasin(スプラバシン)遺伝子との間に位置することを見出した。さらに、これら4種の遺伝子は分泌タンパク質であり、重層化の開始時に発現される遺伝子複合体(遺伝子クラスター)であることを初めて見出した。即ち、上記4種の遺伝子は共通の遺伝子発現調節下にあり、遺伝子複合体を構成している。本発明者らは該遺伝子複合体をSSCと命名した。
- [0035] 本発明は、共通の遺伝子発現調節下にあることを特徴とする遺伝子複合体であって、(1)Kdap遺伝子、(2)dermokine- $\alpha$  遺伝子、(3)dermokine- $\beta$  遺伝子、および(4)suprabasin遺伝子の各遺伝子から構成されるケラチノサイトの分化または増殖に関与する遺伝子複合体を提供する。
- [0036] 本発明の上記遺伝子複合体は、例えば、図3で示すように、マウスにおいては7番染色体上に、ヒトにおいては19番染色体上に位置している。当業者においては、図3で示される情報を基に、本発明の遺伝子複合体の正確な位置、および配列についての情報を、適宜、公共のデータベース、市販の解析ツール等を利用して、取得することが可能である。

本発明の上記遺伝子複合体とは、好ましくは、上記(1)〜(4)の遺伝子を含む、ゲノムDNA断片であり、該遺伝子の共通の発現調節領域を含むことが望ましい。該ゲノムDNA断片は、好ましくは、単離・精製されたDNA断片である。また、該DNA断片は、マウス、またはヒト由来であることが好ましい。

また、好ましい態様においては、本発明の上記ゲノムDNA断片は、特に制限されるものではないが、40kbp(程度)の長さのDNA断片である。

[0037] 本発明は、本発明のポリヌクレオチド(例えば、配列番号:1、3、5または7のいずれかに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド、またはその相補鎖)に相補的な、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチドを提供する。ここで「相補鎖」とは、A:T(ただしRNAの場合はU)、G:Cの塩基対からなる2本鎖核酸の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。このようなヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のヌクレオチドを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15〜100ヌクレオチド、好ましくは15〜35ヌクレオチドの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明のDNAの少なくとも一部若しくは全部の配列を含む少なくとも15ヌクレオチド、好ましくは少なくとも30ヌクレオチドの鎖長のポリヌクレオチドが用いられる。このようなポリヌクレオチドは、好ましくは本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするものである。「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントな条件下で、本発明のポリヌクレオチド(例えば、配列番号:1、3、5または7)とハイブリダイズし、他のポリペプチドをコードするDNAとはハイブリダイズしないことを意味する。

[0038] また、上記ポリヌクレオチドには、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチドが含まれる。このようなポリヌクレオチドには、アンチセンスポリヌクレオチド(アンチセンスDNA/RNA;本発明のポリペプチドをコードする遺伝子

の転写産物と相補的なアンチセンスRNA、および該RNAをコードするDNA) やリボザイム(本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有するRNAをコードするDNA)、およびRNAi効果を有する核酸(siRNA)が含まれる。

[0039] アンチセンスポリヌクレオチドが標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、三重鎖形成による転写開始阻害、RNAポリメラーゼによって局所的に開状ループ構造がつけられた部位とのハイブリッド形成による転写抑制、合成の進みつつあるRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエクソンとの接合点でのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、mRNAとのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、キャッピング部位やポリ(A)付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、mRNAの翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長阻止、および核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制などである。これらは、転写、スプライシング、または翻訳の過程を阻害して、標的遺伝子の発現を抑制する(平島および井上「新生物化学実験講座2 核酸IV 遺伝子の複製と発現」,日本生化学会編,東京化学同人,pp.319-347,1993)。

[0040] 本発明で用いられるアンチセンス核酸(ポリヌクレオチド)は、上記のいずれの作用で標的遺伝子の発現を抑制してもよい。一つの態様としては、遺伝子のmRNAの5'端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的と考えられる。しかし、コード領域もしくは3'側の非翻訳領域に相補的な配列も使用し得る。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含むポリヌクレオチドも、本発明で利用されるアンチセンスポリヌクレオチドに含まれる。使用されるアンチセンスポリヌクレオチドは、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは3'側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。アンチセンスポリヌクレオチド配列は、標的遺伝子またはその一部と相補的な配列であ



ることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に阻害できる限り、完全に相補的でなくてもよい。転写されたRNAは、標的とする遺伝子の転写産物に対して好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相補性を有する。アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、アンチセンスポリヌクレオチドは、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも15ヌクレオチド以上、好ましくは100ヌクレオチド、さらに好ましくは500ヌクレオチド以上の鎖長を有し、通常、3000ヌクレオチド以内、好ましくは2000ヌクレオチド以内の鎖長を有する。

- [0041] 該アンチセンスポリヌクレオチドは、例えば、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド(例えば、配列番号:1、3、5または7)の配列情報を基にホスホロチオネート法(Stein, 1988 Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res 16, 3209-21 (1988))などにより調製することが可能である。
- [0042] 内在性遺伝子の発現の抑制は、また、リボザイムをコードする核酸(ポリヌクレオチド)を利用して行うことも可能である。リボザイムとは触媒活性を有するRNA分子のことをいう。リボザイムには種々の活性を有するものがあるが、中でもRNAを切断する酵素としてのリボザイムの研究により、RNAの部位特異的な切断を目的とするリボザイムの設計が可能となった。リボザイムには、グループIイントロン型や、RNasePに含まれるM1RNAのように400ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる40ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある(小泉誠および大塚栄子, (1990) 蛋白質核酸酵素, 35:2191)。
- [0043] 例えば、ハンマーヘッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15のC15の3'側を切断するが、活性にはU14が9位のAと塩基対を形成することが重要とされ、15位の塩基はCの他にAまたはUでも切断されることが示されている(M.Koizumiら, (1988) FEBS Lett. 228:225)。リボザイムの基質結合部を標的部位近傍のRNA配列と相補的になるように設計すれば、標的RNA中のUC、UUまたはUAという配列を認識する制限酵素的なRNA切断リボザイムを作出することが可能である(M.Koizumiら, (1988) FEBS Lett. 239:285、小泉誠および大塚栄子, (1990) 蛋白質核酸酵素, 35:2191、M.Koizumiら, (1989) Nucleic Acids Res. 17:7059)。



- [0044] また、ヘアピン型リボザイムも、本発明の目的のために有用である。ヘアピン型リボザイムは、例えばタバコリングスポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖に見出される(J.M.Buzayan Nature 323:349,1986)。このリボザイムも、標的特異的なRNA切断を起こすように設計できることが示されている(Y.Kikuchi およびN.Sasaki (1992) Nucleic Acids Res. 19:6751、菊池洋, (1992) 化学と生物 30:112)。
- [0045] また、本発明の上記siRNAの好ましい態様としては、dermokine- $\alpha$ もしくはdermokine- $\beta$  遺伝子に対してRNAi (RNA interference; RNA干渉) 効果を有する二本鎖RNA (siRNA) を挙げることができる。より具体的には、配列番号:1、3、5、または7のいずれかに記載の塩基配列の部分配列に対するセンスRNAおよびアンチセンスRNAからなる二本鎖RNA (siRNA) を挙げることができる。
- [0046] RNAi機構の詳細については未だに不明な部分もあるが、DICERといわれる酵素(RNase III核酸分解酵素ファミリーの一種)が二本鎖RNAと接触し、二本鎖RNAがsmall interfering RNAまたはsiRNAと呼ばれる小さな断片に分解されるものと考えられている。本発明におけるRNAi効果を有する二本鎖RNAには、このようにDICERによって分解される前の二本鎖RNAも含まれる。即ち、そのままの長さではRNAi効果を有さないような長鎖のRNAであっても、細胞においてRNAi効果を有するsiRNAへ分解されることが期待されるため、本発明における二本鎖RNAの長さは、特に制限されない。
- [0047] 例えば、本発明のdermokine遺伝子のmRNAの全長もしくはほぼ全長の領域に対応する長鎖二本鎖RNAを、例えば、予めDICERで分解させ、その分解産物を適宜利用することが可能である。この分解産物には、RNAi効果を有する二本鎖RNA分子 (siRNA) が含まれることが期待される。この方法によれば、RNAi効果を有することが期待されるmRNA上の領域を、特に選択しなくともよい。即ち、RNAi効果を有する本発明のdermokine遺伝子のmRNA上の領域は、必ずしも正確に規定される必要はない。
- [0048] なお、上記RNA分子において一方の端が閉じた構造の分子、例えば、ヘアピン構造を有するsiRNA(shRNA)も本発明に含まれる。即ち、分子内において二本鎖RNA構造を形成し得る一本鎖RNA分子もまた本発明に含まれる。
- [0049] 本発明の上記「RNAi効果により抑制し得る二本鎖RNA」は、当業者においては、該

二本鎖RNAの標的となる本発明のdermokine遺伝子の塩基配列を基に、適宜作製することができる。一例を示せば、配列番号:1、3、5、または7のいずれかに記載の塩基配列をもとに、本発明の二本鎖RNAを作製することができる。即ち、配列番号:1、3、5、または7のいずれかに記載の塩基配列をもとに、該配列の転写産物であるmRNAの任意の連続するRNA領域を選択し、この領域に対応する二本鎖RNAを作製することは、当業者においては、通常の試行の範囲内において適宜行い得ることである。また、該配列の転写産物であるmRNA配列から、より強いRNAi効果を有するsiRNA配列を選択することも、当業者においては、公知の方法によって適宜実施することが可能である。また、一方の鎖(例えば、配列番号:1、3、5、または7のいずれかに記載の塩基配列)が判明していれば、当業者においては容易に他方の鎖(相補鎖)の塩基配列を知ることができる。siRNAは、当業者においては市販の核酸合成機を用いて適宜作製することが可能である。また、所望のRNAの合成については、一般の合成受託サービスを利用することができる。

[0050] さらに、本発明の上記RNAを発現し得るDNA(ベクター)もまた、本発明のdermokine遺伝子の発現を抑制し得る化合物の好ましい態様に含まれる。例えば、本発明の上記二本鎖RNAを発現し得るDNA(ベクター)は、該二本鎖RNAの一方の鎖をコードするDNA、および該二本鎖RNAの他方の鎖をコードするDNAが、それぞれ発現し得るようにプロモーターと連結した構造を有するDNAである。本発明の上記DNAは、当業者においては、一般的な遺伝子工学技術により、適宜作製することができる。より具体的には、本発明のRNAをコードするDNAを公知の種々の発現ベクターへ適宜挿入することによって、本発明の発現ベクターを作製することが可能である。

[0051] 本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチドは、遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターなどを利用して、ex vivo法やin vivo法などにより患者へ投与を行うことが考えられる。

[0052] 本発明は、本発明のポリペプチドに結合する抗体を提供する。ここで「抗体」には、

ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、さらにFabまたは他の免疫グロブリン発現ライブラリーの産物を含むFabフラグメントが含まれる。

[0053] 本発明のポリペプチドまたはその断片もしくは類似体、またはそれらを発現する細胞は、本発明のポリペプチドに結合する抗体を産生するための免疫原としても使用することができる。抗体は、好ましくは、本発明のポリペプチドに免疫特異的である。「免疫特異的」とは、その抗体が他のポリペプチドに対するその親和性よりも本発明のポリペプチドに対して実質的に高い親和性を有することを意味する。

[0054] 本発明のポリペプチドに結合する抗体は、当業者に公知の方法により調製することが可能である。ポリクローナル抗体であれば、例えば、次のようにして得ることができる。本発明のポリペプチドあるいはそのGSTとの融合タンパク質をウサギ等の小動物に免疫し血清を得る。これを、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のポリペプチドをカップリングしたアフィニティーカラム等により精製することにより調製する。また、モノクローナル抗体であれば、例えば、本発明のポリペプチドをマウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞を分離し、マウスミエローマ細胞とポリエチレングリコールなどの試薬により融合させ、これによりできた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、本発明のポリペプチドに結合する抗体を産生するクローンを選択する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のポリペプチドをカップリングしたアフィニティーカラム等により精製することで、調製することが可能である。

[0055] 本発明の抗体は、本発明のポリペプチドやこれを発現する細胞の単離、同定、および精製に利用することができる。

本発明者らは、本発明のヒトdermokine- $\alpha$ 、- $\beta$ 、Kdap、Suprabasinの各タンパク質に対する抗体（ポリクローナル抗体）を、実際に作製することに成功した。本発明の抗体の一例として、後述の実施例に示されるヒトdermokine- $\alpha$ 、- $\beta$ 、Kdap、またはSuprabasinに対する抗体を挙げることができる。

[0056] また、本発明者らによって見出された知見により、dermokineノックアウトマウスを作製することが可能である。該ノックアウト動物(非ヒト動物)は、SSCの生理的役割の検討に非常に有用である。

即ち本発明は、本発明の遺伝子(例えば、dermokine- $\alpha$  / - $\beta$ )の発現が人為的に抑制されている動物(非ヒト動物)に関する。

上記の「遺伝子の発現が人為的に抑制されている」とは、通常、遺伝子対の一方または双方に、ヌクレオチドの挿入、欠失、置換等の遺伝子変異を有することにより該遺伝子の発現が抑制されている状態を指す。正常なタンパク質としての機能が減少または喪失している変異タンパク質が発現している場合も、この「遺伝子の発現の抑制」に含まれる。上記「抑制」には、遺伝子の発現が完全に抑制されている場合のほか、該遺伝子の遺伝子対の一方の遺伝子の発現のみが抑制されている場合も含まれる。

[0057] 本発明において遺伝子の改変の対象となる動物は、通常、ヒト以外の動物であり、好ましくはマウス、ラット、ハムスター、ウサギ等のげっ歯類であり、その中でも特にマウスが好ましい。本発明において遺伝子の改変の対象となるES細胞もまた、げっ歯類に由来するものが好ましく、特にマウス由来が好ましい。なお、一般的に称される「ノックアウト動物」も本発明の遺伝子改変動物に含まれる。

[0058] 本発明の遺伝子改変非ヒト動物(単に、「遺伝子改変動物」と記載する場合あり)において、遺伝子の発現を人為的に抑制する手段としては、遺伝子全体またはその一部を欠損させる方法や遺伝子の発現制御領域の全部またはその一部を欠損させる方法等を例示することができるが、好ましくは遺伝子対の一方または双方に外来遺伝子を挿入することにより遺伝子を不活性化する方法である。即ち、本発明の好ましい態様において、遺伝子改変動物は、遺伝子対の一方または双方に外来遺伝子が挿入されていることを特徴とする。

[0059] 本発明の遺伝子改変動物は、当業者においては一般的に公知の遺伝子工学技術により作製することができる。例えば、以下のようにして遺伝子改変マウスを作製することができる。まず、マウスから本発明の遺伝子(例えば、dermokine- $\alpha$  / - $\beta$ )のエクソン部分を含むDNAを単離し、このDNA断片に適当なマーカー遺伝子を挿入し、タ



ターゲットベクターを構築する。このターゲットベクターをエレクトロポレーション法などによりマウスのES細胞株に導入し、相同組み換えを生じた細胞株を選抜する。挿入するマーカー遺伝子としては、ネオマイシン耐性遺伝子などの抗生物質耐性遺伝子が好ましい。抗生物質耐性遺伝子を挿入した場合には、抗生物質を含む培地で培養するだけで相同組み換えを生じた細胞株を選抜することができる。また、より効率的な選抜を行うためには、ターゲットベクターにチミジンキナーゼ遺伝子などを結合させておくことも可能である。これにより、非相同組み換えを起こした細胞株を排除することができる。また、PCRおよびサザンブロットにより相同組み換え体の検定を行い、本発明の遺伝子の遺伝子対の一方が不活性化された細胞株を効率よく得ることもできる。

[0060] 相同組み換えを生じた細胞株を選抜する場合、相同組み換え箇所以外にも、遺伝子挿入による未知の遺伝子破壊の恐れがあることから、複数のクローンを用いてキメラ作製を行うことが好ましい。得られたES細胞株をマウス胚盤葉にインジェクションしキメラマウスを得ることができる。このキメラマウスを交配させることで、本発明の遺伝子の遺伝子対の一方を不活性化したマウスを得ることができる。さらに、このマウスを交配させることで、本発明の遺伝子の遺伝子対の双方を不活性化したマウスを取得することができる。マウス以外のES細胞が樹立された動物においても、同様の手法により、遺伝子改変を行うことができる。

[0061] また、本発明の遺伝子の遺伝子対の双方を不活性化したES細胞株は、以下の方法により取得することも可能である。すなわち、遺伝子対の一方を不活性化したES細胞株を高濃度の抗生物質を含む培地で培養することにより、遺伝子対のもう一方も不活性化された細胞株、即ち、本発明の遺伝子の遺伝子対の双方を不活性化したES細胞株を得ることができる。また、遺伝子対の一方を不活性化したES細胞株を選抜し、この細胞株に再度ターゲットベクターを導入し、相同組換えを生じた細胞株を選択することでも作製することができる。ターゲットベクターに挿入するマーカー遺伝子は、前出のマーカー遺伝子とは異なるものを使用することが好ましい。

[0062] また本発明は、本発明の遺伝子改変非ヒト動物から樹立された細胞株を提供する。



本発明の遺伝子改変動物由来の細胞株を樹立する方法としては、公知の方法を利用することができる。例えば、げっ歯類においては、胎仔細胞の初代培養の方法を用いることが可能である。(新生化学実験講座、18巻、125頁～129頁、東京化学同人、およびマウス胚の操作マニュアル、262頁～264頁、近代出版)。

[0063] 本発明の遺伝子改変動物、該動物から樹立した細胞株、およびES細胞株は、本発明の遺伝子の詳細な機能の解析に利用することができる。さらに、本発明の遺伝子改変動物は、本発明のタンパク質の機能を代替する化合物のスクリーニング方法等に利用することが可能である。

[0064] また、本発明の上記ポリペプチド(タンパク質)は、ケラチノサイト分化誘導作用を有することが期待される。従って本発明は、本発明の上記ポリペプチド(タンパク質)を有効成分として含む、ケラチノサイト分化誘導剤(本明細書においては、「分化誘導剤」と記載する場合あり)に関する。

好ましい態様において本発明は、dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質を有効成分として含むケラチノサイト分化誘導剤を提供する。上記dermokine- $\alpha$  タンパク質としては、例えば、配列番号:2または6に記載のポリペプチドを挙げることができる。また、上記dermokine- $\beta$  タンパク質としては、例えば、配列番号:4または8に記載のポリペプチドを示すことができる。

また、本発明の分化誘導剤の成分である上記ポリペプチドをコードするDNAもまた、本発明に含まれる。

[0065] また本発明は、SSCあるいはdermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質の発現活性化物質を含む、ケラチノサイト分化誘導剤に関する。

本発明における「タンパク質の発現活性化物質」は、タンパク質の発現を有意に活性化(上昇)させる物質(化合物)である。本発明の上記「発現活性化」には、該タンパク質をコードする遺伝子の転写活性化、および／または該遺伝子の転写産物からの翻訳活性化が含まれる。

[0066] 本発明のSSCもしくはdermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質の発現活性化物質としては、例えば、SSCもしくはdermokine- $\alpha$  /  $\beta$  遺伝子の転写調節領域(例えば、プロモーター領域)に結合して、該遺伝子の転写を促進する物質(転写活性化因子等)を挙げるこ

とができる。

[0067] また、本発明においてSSCもしくはdermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質の発現活性の測定は、当業者においては周知の方法、例えば、RT-PCR法、ノーザンブロット法、ウェスタンブロット法等により、容易に実施することができる。

[0068] また、dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質(本明細書においては、これら2つのタンパク質(遺伝子)を合わせて「dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質(遺伝子)」と記載する場合あり)の発現または機能を抑制する物質(化合物)は、ケラチノサイト分化抑制作用を有することが期待される。従って本発明は、dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質の発現もしくは機能阻害物質(化合物)を有効成分として含む、ケラチノサイト分化抑制剤(本明細書においては、「分化抑制剤」と記載する場合あり)に関する。

[0069] 本発明における「発現阻害物質」は、タンパク質の発現を有意に低下させる、あるいは、発現を完全に抑制させる物質(化合物)である。本発明の上記「発現阻害」には、該タンパク質をコードする遺伝子の転写阻害、および／または該遺伝子の転写産物からの翻訳阻害が含まれる。

[0070] 上記分化抑制剤の好ましい態様としては、以下の(a)～(d)からなる群より選択される化合物を有効成分として含む薬剤である。

(a) dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  遺伝子の転写産物またはその一部に対するアンチセンス核酸

(b) dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  遺伝子の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有する核酸

(c) dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  遺伝子の発現をRNAi効果による阻害作用を有する核酸

(d) dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質と結合する抗体(抗dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質抗体)

[0071] 本発明の上記薬剤における核酸としては、例えば、上述のアンチセンス核酸、およびリボザイム活性を有する核酸を好適に示すことができる。また、内在性遺伝子の発現の阻害は、さらに、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有する二本鎖RNAを用いたRNA干渉(RNA interference; RNAi)によっても行うことができる。RNAiとは、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有する二重鎖RNAを細胞内に導

入すると、導入した外来遺伝子および標的内在性遺伝子の発現がいずれも阻害される現象のことを指す。RNAiの機構の詳細は明らかではないが、最初に導入した二本鎖RNAが小片に分解され、何らかの形で標的遺伝子の指標となることにより、標的遺伝子が分解されると考えられている。RNAiに用いるRNAは、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  遺伝子もしくは該遺伝子の部分領域と完全に同一である必要はないが、完全な相同性を有することが好ましい。

[0072] また、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質の機能阻害物質としては、本発明の上記抗体、例えば、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質に結合する抗体(dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質を認識する抗体；抗dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質抗体)を挙げることができる。該抗体は、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質と結合することにより、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質の機能を阻害し、その結果、ケラチノサイトの分化が誘導されることが期待される。本発明の上記抗体は、特に制限されないが、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  以外のタンパク質とは結合せず、特異的にdermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質と結合する(dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質を認識する)抗体であることが好ましい。

[0073] 本発明のdermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質に結合する抗体は、例えば、ケラチノサイトの分化抑制を目的とした使用が考えられる。得られた抗体を人体に投与する目的(抗体治療)で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト抗体やヒト型抗体が好ましい。

本発明のケラチノサイト分化誘導剤は、ケラチノサイトの分化異常(分化誘導の低下)に起因する疾患の治療薬となることが期待される。該疾患としては、例えば、不全角化を伴う尋常性乾癬、日光角化症等を挙げることができる。

[0074] また、本発明のケラチノサイト分化抑制剤は、ケラチノサイトの分化亢進に起因する疾患の治療薬となることが期待される。該疾患としては、例えば、過角化を伴う尋常性魚鱗癬、伴性遺伝性魚鱗癬、尋常性疣贅、アミロイド苔癬及び顆粒層肥厚を伴う扁平苔癬、水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症等の皮膚疾患を挙げることができる。

[0075] 本発明のケラチノサイト分化誘導剤またはケラチノサイト分化抑制剤(本明細書においては、双方をまとめて「薬剤」と記載する場合あり)は、生理学的に許容される担体、賦形剤、あるいは希釈剤等と混合し、医薬組成物として経口、あるいは非経口的

に投与することができる。経口剤としては、顆粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、溶剤、乳剤、あるいは懸濁剤等の剤型とすることができる。非経口剤としては、注射剤、点滴剤、外用薬剤、あるいは座剤等の剤型を選択することができる。注射剤には、皮下注射剤、筋肉注射剤、あるいは腹腔内注射剤等を示すことができる。外用薬剤には、経鼻投与剤、あるいは軟膏剤等を示すことができる。主成分である本発明の分化誘導剤を含むように、上記の剤型とする製剤技術は公知である。

[0076] 例えば、経口投与用の錠剤は、本発明の薬剤に賦形剤、崩壊剤、結合剤、および滑沢剤等を加えて混合し、圧縮整形することにより製造することができる。賦形剤には、乳糖、デンプン、あるいはマンニトール等が一般に用いられる。崩壊剤としては、炭酸カルシウムやカルボキシメチルセルロースカルシウム等が一般に用いられる。結合剤には、アラビアゴム、カルボキシメチルセルロース、あるいはポリビニルピロリドンが用いられる。滑沢剤としては、タルクやステアリン酸マグネシウム等が公知である。

[0077] 本発明の薬剤を含む錠剤は、マスキングや、腸溶性製剤とするために、公知のコーティングを施すことができる。コーティング剤には、エチルセルロースやポリオキシエチレングリコール等を用いることができる。

[0078] また注射剤は、主成分である本発明の薬剤を適当な分散剤とともに溶解、分散媒に溶解、あるいは分散させることにより得ることができる。分散媒の選択により、水性溶剤と油性溶剤のいずれの剤型とすることもできる。水性溶剤とするには、蒸留水、生理食塩水、あるいはリンゲル液等を分散媒とする。油性溶剤では、各種植物油やプロピレングリコール等を分散媒に利用する。このとき、必要に応じてパラベン等の保存剤を添加することもできる。また注射剤中には、塩化ナトリウムやブドウ糖等の公知の等張化剤を加えることができる。更に、塩化ベンザルコニウムや塩酸プロカインのような無痛化剤を添加することができる。

[0079] 本発明の薬剤は、固形、液状、あるいは半固形状の組成物とすることにより外用剤とすることができる。固形、あるいは液状の組成物については、先に述べたものと同様の組成物とすることで外用剤とすることができる。半固形状の組成物は、適当な溶剤に必要に応じて増粘剤を加えて調製することができる。溶剤には、水、エチルアルコール、あるいはポリエチレングリコール等を用いることができる。増粘剤には、一般



にベントナイト、ポリビニルアルコール、アクリル酸、メタクリル酸、あるいはポリビニルピロリドン等が用いられる。この組成物には、塩化ベンザルコニウム等の保存剤を加えることができる。また、担体としてカカオ脂のような油性基材、あるいはセルロース誘導体のような水性ゲル基材を組み合わせるにより、座剤とすることもできる。

[0080] 本発明の薬剤は、安全とされている投与量の範囲内において、ヒトを含む哺乳動物に対して、必要量が投与される。本発明の薬剤の投与量は、剤型の種類、投与方法、患者の年齢や体重、患者の症状等を考慮して、最終的には医師または獣医師の判断により適宜決定することができる。

[0081] また、本発明の薬剤(ケラチノサイト分化誘導剤・抑制剤)は、上述の疾患以外にも、例えば、乾燥皮膚、ふけ、にきび、角化症、湿疹、皮膚のはがれ、そう痒症、老人斑、ほくろ、黒皮症、しわ、いぼ、皮膚の斑点、過色素沈着皮膚、過角化性皮膚、炎症性皮膚、年齢関連皮膚変化、等の表皮の異常な生物学的症状もしくは傷害に対して、治療もしくは予防効果を有することが期待される。本発明の薬剤は、通常、ヒトに対して使用されるが、例えば、イヌ、ネコ等の皮膚疾患に対して用いることも可能である。

[0082] また本発明は、ケラチノサイト分化誘導剤(分化誘導作用を有する化合物)のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法の好ましい態様においては、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質の発現量または活性を指標とする方法である。即ち、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質の発現もしくは活性を上昇させる化合物は、ケラチノサイト分化誘導作用を有することが期待される。

[0083] 本発明の上記方法においては、まず、dermokine- $\alpha$  および / または  $\beta$  タンパク質(遺伝子)を発現する細胞に被検化合物を接触させる。

本方法に用いる「細胞」は、特に制限されないが、好ましくはヒト由来の細胞である。「dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質を発現する細胞」としては、内因性のdermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質を発現している細胞、または外来性のdermokine- $\alpha$  /  $\beta$  遺伝子が導入され、該遺伝子が発現している細胞を利用することができる。外来性のdermokine- $\alpha$  /  $\beta$  遺伝子が発現した細胞は、通常、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  遺伝子が挿入された発現



ベクターを宿主細胞へ導入することにより作製することができる。該発現ベクターは、一般的な遺伝子工学技術によって作製することができる。

- [0084] 本発明のスクリーニング方法に供する被検化合物としては、特に制限はない。例えば、天然化合物、有機化合物、無機化合物、タンパク質、ペプチドなどの単一化合物、並びに、化合物ライブラリー、遺伝子ライブラリーの発現産物、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物等が挙げられるが、これらに限定されない。

また、これらの被検化合物は必要に応じて適宜標識して用いることができる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識等を挙げることができる。

- [0085]  $\text{dermokine-}\alpha/\beta$  遺伝子を発現する細胞への被検化合物の「接触」は、通常、 $\text{dermokine-}\alpha/\beta$  遺伝子を発現する細胞の培養液に被検化合物を添加することによって行うが、この方法に限定されない。被検化合物がタンパク質等の場合には、該タンパク質を発現するDNAベクターを、該細胞へ導入することにより、「接触」を行うことができる。

- [0086] 本方法においては、次いで、 $\text{dermokine-}\alpha/\beta$  タンパク質を発現する細胞における $\text{dermokine-}\alpha/\beta$  タンパク質の発現量または活性を測定する。発現量の測定は、当業者が簡便に行い得るものであり、一般的な方法、例えばノーザンブロット法、ウェスタンブロット法等により適宜実施することが可能である。例えば、 $\text{dermokine-}\alpha/\beta$  タンパク質を発現する細胞に接触させた被検化合物に付した標識を指標にして測定することも可能である。

- [0087] 尚、本発明において「発現」とは、タンパク質をコードする遺伝子からの転写(mRNAの生成)、または該遺伝子の転写産物からの翻訳のいずれの場合をも意味する。

また、 $\text{dermokine-}\alpha/\beta$  タンパク質の活性を指標にして上記スクリーニング方法を実施する場合には、 $\text{dermokine-}\alpha/\beta$  タンパク質の上述の機能(活性)、例えば、 $\text{dermokine-}\alpha/\beta$  タンパク質のケラチノサイトの分化誘導活性を指標とすることができる。 $\text{dermokine-}\alpha/\beta$  タンパク質の活性の測定は、当業者においては、公知の方法によって適宜実施することができる。

本発明の方法において、上記「活性」としては、好ましくは、上述の「 $\text{dermokine-}\alpha$

／ $\beta$ タンパク質をケラチノサイトに発現させることにより該ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性」を挙げることができる。

[0088] 本方法においては、次いで、被検化合物を接触させない場合と比較して、dermokine- $\alpha$ ／ $\beta$ タンパク質の発現量または活性を上昇させる化合物を選択する。

上記スクリーニング方法によって取得される化合物は、例えば、ケラチノサイトの分化異常に起因する疾患の治療薬となることが期待される。

[0089] また本発明は、ケラチノサイト分化抑制剤(分化誘導作用を有する化合物)のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法の好ましい態様においては、dermokine- $\alpha$ ／ $\beta$ タンパク質の発現量または活性を指標とする方法である。即ち、dermokine- $\alpha$ ／ $\beta$ タンパク質の発現もしくは活性を低下(阻害)させる化合物は、ケラチノサイト分化抑制作用を有することが期待される。

[0090] 本発明の上記方法においては、上述の分化誘導剤のスクリーニング方法に倣って、適宜、実施することができる。即ち、本発明の上記方法においては、まず、dermokine- $\alpha$ および／または $\beta$ タンパク質(遺伝子)を発現する細胞に被検化合物を接触させる。次いで、被検化合物を接触させない場合と比較して、dermokine- $\alpha$ ／ $\beta$ タンパク質の発現量または活性を低下させる化合物を選択する。

[0091] 上記スクリーニング方法によって取得される化合物は、例えば、ケラチノサイトの分化亢進に起因する疾患の治療薬となることが期待される。

本発明の上記スクリーニング方法の好ましい態様としては、上記の「dermokine- $\alpha$ ／ $\beta$ タンパク質をケラチノサイトに発現させることにより該ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性」を指標とするスクリーニング方法である。

[0092] 即ち本発明は、以下の工程(a)～(c)を含む、ケラチノサイト分化誘導剤のスクリーニング方法に関する。

(a) dermokine- $\alpha$ タンパク質もしくはdermokine- $\beta$ タンパク質を発現するケラチノサイトと、被検化合物を接触させる工程

(b) 前記dermokine- $\alpha$ タンパク質もしくはdermokine- $\beta$ タンパク質の、ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性を測定する工程

(c)被検化合物を接触させない場合と比較して、前記活性を上昇させる化合物を選択する工程

[0093] また本発明は、以下の工程(a)ー(c)を含む、ケラチノサイト分化抑制剤のスクリーニング方法を提供する。

(a) dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質を発現するケラチノサイトと、被検化合物を接触させる工程

(b) 前記dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質の、ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性を測定する工程

(c) 被検化合物を接触させない場合と比較して、前記活性を低下させる化合物を選択する工程

[0094] また、本発明の別の態様としては、以下の工程(a)ー(c)を含む、ケラチノサイト分化誘導剤のスクリーニング方法である。

(a) dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質、またはそれらを発現する細胞と、ケラチノサイト及び被検化合物を共存させる工程

(b) ケラチノサイトの重層上皮細胞への分化を測定する工程

(c) 被検化合物を共存させない場合と比較して、重層上皮細胞への分化を上昇させる化合物を選択する工程

[0095] さらに本発明の別の態様においては、以下の工程(a)ー(c)を含む、ケラチノサイト分化抑制剤のスクリーニング方法に関する。

(a) dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質、またはそれらを発現する細胞と、ケラチノサイト及び被検化合物を共存させる工程

(b) ケラチノサイトの重層上皮細胞への分化を測定する工程

(c) 被検化合物を共存させない場合と比較して、重層上皮細胞への分化を低下させる化合物を選択する工程

[0096] 上記工程(a)におけるdermokine- $\alpha$  / - $\beta$  タンパク質を発現する細胞は、ケラチノサイトと一緒に培養できればいかなる細胞でも許され、ケラチノサイトそのものであっても良い。好ましくはケラチノサイトである。dermokine- $\alpha$  / - $\beta$  タンパク質を発現する細胞は、通常、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質をコードするDNAを発現可能な状態で

保持するベクター (dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  発現ベクター) を、ケラチノサイトへ導入することにより、作製することができる。

[0097] また、上記工程 (b) における「dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質をケラチノサイトに発現させることにより該ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性」は、例えば、重層上皮の分化マーカー、好ましくは、インボルクリンの発現を指標として、適宜、測定することができる。例えば、上記インボルクリンの発現を上昇させる化合物は、ケラチノサイト分化誘導作用を有するものと判定され、インボルクリンの発現を低下させる化合物は、ケラチノサイト分化抑制作用を有するものと判定される。

[0098] また本発明のdermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質は、重層上皮において発現していることから、例えば、重層上皮から派生した癌細胞のマーカーとなることが期待される。本発明のdermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質の発現もしくは活性の有無を指標とすることにより、所望の癌細胞について、重層上皮から派生した癌細胞であるか否かの判定を行うことが可能である。本発明は、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質の発現もしくは活性の有無を指標とする、被検細胞について、重層上皮から派生した癌細胞であるか否かの検査方法を提供する。

[0099] 本発明の上記検査方法の好ましい態様においては、以下の工程 (a) および (b) を含む方法である。

(a) 被検細胞について、dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質の発現量または活性を測定する工程、

(b) 対照と比較して、前記発現量または活性が変化している場合に、被検細胞は重層上皮から派生した癌細胞であるものと判定する工程

[0100] 上記工程 (a) における「測定」は、上述の方法によって、適宜実施することができる。また、上記工程 (b) における「対照」とは、通常、正常細胞を指す。具体的には、癌細胞ではないことが予め判明している細胞であり、一般的には、健常者由来の細胞である。また、重層上皮から派生した癌細胞ではないことが予め判明している癌細胞を、上記「対照」として用いることも可能である。

[0101] 本発明の上記工程 (b) においては、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  の発現もしくは活性が、対照と比較して変化している細胞は、重層上皮から派生した癌細胞、例えば扁平上皮



癌細胞であるものと判定することができる。

[0102] 本発明において上記「変化」とは、通常、「上昇」および「減少」を意味するが、好ましくは「減少」を指す。従って、本発明の好ましい態様においては、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  の発現もしくは活性が、対照と比較して減少している細胞は、重層上皮から派生した癌細胞、例えば扁平上皮癌細胞であるものと判定することができる。

[0103] 本発明のタンパク質は、重層上皮から派生する増殖、分化異常疾患に関与することが考えられる。例えば、皮膚癌、食道癌、子宮頸癌、肺癌、胸腺癌等は、重層扁平上皮(肺癌の場合は、偽重層上皮)から派生した扁平上皮癌や基底細胞癌が良く認められる。本発明のタンパク質(遺伝子)は、これらの癌において癌の進行度または分化度に関与していることが予測され、即ち、これらの癌のマーカーとして有用である。本発明においては、上記「重層上皮から派生した癌細胞」とは、好ましくは、上述の癌の細胞を指す。特に、元々重層扁平上皮ではない肺の気管支(偽重層上皮)の扁平上皮癌には、本発明の上記方法は有効である。

[0104] また、上記検査方法を用いて、被検者について、扁平上皮癌もしくは基底細胞癌に罹患しているか否かの診断を行うことが可能である。即ち、本発明は、以下の工程(a)および(b)を含む、被検者について、扁平上皮癌または基底細胞癌の診断方法に関する。

(a)被検者から調製された細胞試料について、本発明の上記検査方法により、重層上皮から派生した癌細胞か否かを判定する工程

(b)前記工程により、重層上皮から派生した癌細胞であるものと判定された場合に、被検者は、扁平上皮癌または基底細胞癌に罹患しているものと判定する工程

[0105] また本発明は、血液等の体液を被検試料として上記検査(診断)方法を行うことが可能である。本発明のタンパク質は、分泌タンパク質であることから、特に、血中に本発明のタンパク質が分泌された場合には、重層上皮から派生する癌、例えば、食道癌、または肺癌等の診断を適宜、実施することが可能である。

[0106] また、本発明のタンパク質は、種々の皮膚疾患に関与することが考えられる。例えば、表皮のターンオーバーが亢進している乾癬等の病態においては、その基底層が著しく増大し、増殖が亢進し、錯角化等が起こっている。また、扁平苔癬等において

は、錯角化を伴わない角質肥厚や顆粒層の肥厚が認められる。上記のような分化、増殖異常に起因する疾患にも、本発明のタンパク質（例えば、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$ ）が関与していることが考えられる。

[0107] 本発明は、以下の工程(a)および(b)を含む、被検者について、皮膚疾患の診断方法を提供する。

(a)被検者から調製された被検試料について、dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくは dermokine- $\beta$  タンパク質の発現量または活性を測定する工程

(b)対照と比較して、前記発現量または活性が変化している場合に、被検者は皮膚疾患に罹患しているものと判定する工程

[0108] 上記方法においては、工程(b)における発現量もしくは活性が上昇している場合に、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  の発現もしくは活性の亢進に伴う皮膚疾患に罹患しているものと判定される。一方、発現量もしくは活性が低下している場合に、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  の発現もしくは活性の低下に伴う皮膚疾患に罹患しているものと判定される。

[0109] 上記「皮膚疾患」とは、通常、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質の発現もしくは活性の「変化」に伴う(起因する)疾患を言う。より具体的には、皮膚疾患として、乾癬、扁平苔癬、角化症、湿疹、そう痒症、黒皮症、炎症性皮膚炎等を挙げることができる。

[0110] また上記診断方法に供することができる生体試料として、例えば、被検者の皮膚組織(細胞)等を挙げることができるが、被検者由来の細胞もしくは細胞抽出物を含む試料であれば、特に制限されない。

また、本発明において被検者とは、通常、ヒトを指すが、本発明のタンパク質(例えば、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$ )を有する生物であれば特に制限されない。例えば、イヌ、ネコ等の動物について、本発明の検査・診断方法(例えば、皮膚疾患の診断方法)を実施することも可能である。

[0111] なお、本発明においてdermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質の発現もしくは活性の測定は、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質を構成要素として含む複合体のSSCについて、その発現もしくは活性を測定することによっても実施することが可能である。

[0112] また本発明は、dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質、あるいは上記スクリーニング方法によって得られるケラチノサイト分化誘導剤を個体(例えば、

患者等)へ投与することを特徴とする、ケラチノサイト分化誘導能低下に起因する疾患の治療もしくは予防方法に関する。

[0113] また本発明は、以下の(a)ー(d)からなる群より選択される化合物、あるいは上記スクリーニング方法によって得られる(治療上有効量の)ケラチノサイト分化抑制剤を個体へ投与することを特徴とする、ケラチノサイト分化亢進に起因する疾患の治療もしくは予防方法に関する。

(a) dermokine- $\alpha$  遺伝子もしくはdermokine- $\beta$  遺伝子の転写産物に対するアンチセンス核酸

(b) dermokine- $\alpha$  遺伝子もしくはdermokine- $\beta$  遺伝子の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有する核酸

(c) dermokine- $\alpha$  遺伝子もしくはdermokine- $\beta$  遺伝子の発現を、RNAi効果による阻害作用を有する核酸

(d) dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質と結合する抗体

[0114] また本発明は、dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質、あるいは上記スクリーニング方法によって得られるケラチノサイト分化誘導剤の、ケラチノサイト分化誘導低下に起因する疾患の治療剤の製造における使用に関する。

[0115] また本発明は、以下の(a)ー(d)からなる群より選択される化合物、あるいは上記スクリーニング方法によって得られるケラチノサイト分化抑制剤の、ケラチノサイト分化亢進に起因する疾患の治療剤の製造における使用に関する。

(a) dermokine- $\alpha$  遺伝子もしくはdermokine- $\beta$  遺伝子の転写産物に対するアンチセンス核酸

(b) dermokine- $\alpha$  遺伝子もしくはdermokine- $\beta$  遺伝子の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有する核酸

(c) dermokine- $\alpha$  遺伝子もしくはdermokine- $\beta$  遺伝子の発現を、RNAi効果による阻害作用を有する核酸

(d) dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質と結合する抗体

[0116] なお、本発明におけるケラチノサイト分化誘導低下に起因する疾患としては、例えば尋常性乾癬あるいは日光角化症を挙げることができる。また、本発明におけるケラ

チノサイト分化亢進に起因する疾患としては、例えば過角化を伴う尋常性魚鱗癬、伴性遺伝性魚鱗癬、尋常性疣贅、アミロイド苔癬及び顆粒層肥厚を伴う扁平苔癬、あるいは水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症を挙げることができる。

[0117] 本発明の治療もしくは予防方法における個体とは、通常、上記疾患の患者を指し、特に制限されないが好ましくはヒトである。

[0118] 患者への投与は一般的には、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射など当業者に公知の方法により行うことができる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。

[0119] 遺伝子治療用ベクターとしては、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターなどを例示することができる。該ベクターを利用して、ex vivo法やin vivo法などにより患者へ目的のDNAの投与を行うことができる。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

## 実施例

[0120] 以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[0121] [細胞培養および抗体]

正常ヒト胚ケラチノサイト(NHEK)は、供給元(KURABO、Osaka、Japan)による初代培養後に凍結細胞として購入した。NHEK細胞を無血清培地Humedia KG2(KURABO)中で培養した。293/EBNA-1細胞はInvitrogen社(San Diego、CA)から購入し、10%ウシ胎仔血清を加えたダルベッコ変法イーグル培地(Sigma)中で維持した。抗His抗体(Penta・His Antibody,BSA free)は QIAGEN (Valencia, CA)より購入した。

[0122] [マウス皮膚cDNAライブラリーの構築および均等化、ならびにDIG標識RNAプローブの調製]



cDNAライブラリーは、以前に記述された方法 (Komiya T, Tanigawa Y, Hirohashi S: Anal. Biochem. 254:23-30, 1997) に従って構築および均等化した。簡潔に述べると、マウス背部皮膚 (8週齢雌Balb/cマウス) の全RNAから、NotI制限部位を用い、オリゴ\_(dT)プライマーを用いてマウス皮膚cDNAを構築した。cDNAをPCRにより増幅した後に、以前に記載された方法に従って (Ko: Nucleic Acids Res. 18:5705-5711, 1990 ; Takahashi N, Ko MSH: Genomics 23:202-210, 1994)、均等化サイクルを2回行った。均等化の各段階 (E1およびE2) におけるCot値はそれぞれ10および100であった。

- [0123] 均等化の評価は定量的リアルタイムPCR分析によって、以下に記述されているように二重化して行なった。以下に示す各遺伝子特異的なプライマー対は、各cDNA配列であるNM016958、NM027011、NM008401およびNM008508より構築した：  
マウスケラチン14 (5'-GGACGCCCACCTTTCATCTTC-3' (配列番号:9):順方向、5'-ATCTGGCGGTTGGTGGAGG-3' (配列番号:10):逆方向)、  
マウスケラチン5 (5'-CAGTTCTACATTTGTGTTGCACGTC-3' (配列番号:11):順方向、5'-TTGGACAGACTCTGGAGGAAGTCAG-3' (配列番号:12):逆方向)、  
マウスインテグリン  $\alpha$ -M (5'-TTGAAAGGACCCCAGTGCTGAACTGC-3' (配列番号:13):順方向、5'-ATGGAGCTGCCCACAATGAGTGGTACAG-3' (配列番号:14):逆方向)、および  
マウスロクリン (5'-CCTACCTGGCCGTGCAAG-3' (配列番号:15):順方向、5'-CATGAGAAAGTTAAGCCCATCG-3' (配列番号:16):逆方向)。同じ量の、均等化したライブラリー (E1およびE2) およびスターティングライブラリー (E0) をPCR解析に利用した。全データは内部標準について標準化した (ロクリン;  $\Delta$  Ct metod, User Bulletin 2, Applied Biosystems)。

- [0124] E2ライブラリーをNotIおよびSalIで消化し、得られた断片をpBlueScript KS(-) (Stratagene, La Jolla, CA) 中にクローニングした。コロニーを無作為に選択し、cDNA挿入物を、Native Pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) を用い、ベクタープライマーの対を利用するPCRによって増幅した。増幅断片には、ベクターに由来するT3およびT7 RNAポリメラーゼプロモーター配列が追加される。アンチセンスプローブ (Stratagene) を作製するために、T7 RNAポリメラーゼを用いるcRNA転写をNunc MicroWell™ プレ

ート(Nunc, Roskilde, Denmark)において行った。センスプローブはT3 RNAポリメラーゼ(Stratagene)を用いることによって作製した。

[0125] [ハイスループットin situハイブリダイゼーション(HT-ISH)]

96ウェルのプレートにおけるHT-ISHを以前に記述された通りに行った(Komiya T, Tanigawa Y, Hirohashi S: Anal. Biochem. 254:23-30, 1997)。簡潔に述べると、成体マウス足蹠皮膚を8週齢の雌Balb/cマウスから新たに単離した。単離した皮膚をリン酸緩衝食塩水(PBS)中で1%ジエチルピロカルボネート(DEPC)により室温で1時間かけて固定した。それから試料を脱水し、包埋し、切片を作製し、マウントおよび96ウェルプレートにハイブリダイゼーションした。

[0126] [ノーザンブロット]

種々の成体マウス組織由来の全RNAを、ChomczynskiおよびSacchiにより記載された方法に従って調製した(Chomczynski P, Sacchi N: Anal. Biochem. 162:23-30, 1997.)。全RNA(20  $\mu$ g)を電気泳動し、Hybond-N+膜(Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, U.K.)に移行させた。

dermokine- $\alpha$  / - $\beta$  (図2BのSK063F08)、dermokine- $\beta$  (図2Bの $\beta$ -probe)、Kdap(XM149907)およびsuprabasin(318-765bp of BC051531)のcDNA断片はDIG RNA標識キット(Roche Applied Science)を用いて、DIG標識を施した。DIG標識RNAプローブとのハイブリダイゼーションは、製造者(Roche Applied Science)により記載されたプロトコールに従って行った。種々の段階の胚発生におけるdermokine- $\alpha$  /  $\beta$  の発現を、Mouse Embryo Full Stage Blot(Seegene, Seoul, Korea)を用いて評価した。

[0127] [SEAP融合タンパク質のためのcDNAクローニングおよび構築]

第一鎖cDNAは、Superscript II逆転写酵素(Invitrogen)を用いてヒト皮膚全RNA(Stratagene)から調製した。ヒトdermokine- $\alpha$  および- $\beta$  のORFをコードするDNA断片は、5'Sall-dermokine- $\alpha$  プライマー(配列番号:17/GTCGACGCCACCATGAACATGAAGCCGGCCACTGC)/3'NotI-dermokine- $\alpha$  プライマー(配列番号:18/GCGGCCGCCCCAAACTTCACCCACTGCAGCAGG)および5'Sall-dermokine- $\beta$  プライマー(配列番号:19/GTCGACGCCACCATGAAGTTCCAGGGGCCCCCTGG)/3'NotI-dermokine- $\beta$  プ

ライマー(配列番号:20/GCGGCCGCCCCAAACTTCACCCACTGCAGCAGG)をそれぞれ用いるPCRによって増幅した。ヒトKdapおよびsuprabasin(0.7-kb断片; Park GT, Lim SE, Jang S, Morasso MI: Suprabasin, a novel epidermal differentiation marker and potential cornified envelope precursor. J. Biol. Chem. 277:45195-45202, 2002.)のcDNAは、5'Sall-Kdapプライマー(配列番号:21/GTCGACGCCACCATGAAGATCCCGGTCCTTCCTGCC)/3'NotI-Kdapプライマー(配列番号:22/GCGGCCGCCTGGGCATCAGGAGTTGCGCTC)および5'Sall-suprabasinプライマー(配列番号:23/AATTGTCGACGCCACCATGCATCTTGCACGTCTGGTCGG)/3'NotI-suprabasinプライマー(配列番号:24/ATATGCGGCCGCGCAGCTGGTTGGCCTCCTTGCTGG)をそれぞれ用いることによって増幅した。これらのプライマーは以下のGenBankアクセッション番号に基づいて設計した:AK003695(dermokine- $\alpha$ )、BC035311(dermokine- $\beta$ )、BX112106(Kdap)およびBC063640(suprabasin)。

- [0128] これらのcDNAを、(His)<sub>6</sub> COOH末端タグでそれ自身のシグナルペプチドを欠いている分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)をコードしているcDNAの5'末端へ融合させた。pcDNA3.1-SEAP(His)<sub>6</sub>ベクターと命名したSEAP(His)<sub>6</sub>発現ベクターをpDREF-SEAP(His)<sub>6</sub>から構築した(Ikeda W, Kakunaga S, Itoh S, Shingai T, Takeuni K, Satoh K, Inoue Y, Hamaguchi A, Morimoto K, Takeuchi M, Imai T, Takai Y: J. Biol. Chem. 278:28167-28172, 2003)。SallおよびNotIによる消化後に、dermokine- $\alpha$ 、dermokine- $\beta$ 、Kdap、およびsuprabasinのcDNAをpcDNA3.1-SEAP(His)<sub>6</sub>中のSall-NotI部位にクローニングし、それぞれpcDNA3.1-dermokine- $\alpha$ -SEAP(His)<sub>6</sub>、pcDNA3.1-dermokine- $\beta$ -SEAP(His)<sub>6</sub>、pcDNA3.1-Kdap-SEAP(His)<sub>6</sub>およびpcDNA3.1-suprabasin-SEAP(His)<sub>6</sub>を得た。これら発現ベクターをTransIT LT1(Mirus, Madison, WI)を用いることにより、293/EBNA-1細胞に導入した。TALON Superflow Metal Affinity Resin(BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA)を使用したものを除いて、一時的に発現させ、培地中に分泌させたSEAP融合タンパク質を以前に記載した通りに精製した(Imai T, Baba M, Nishimura M, Kakizai M, Takagi S,

Yoshie O: J. Biol. Chem. 272:15036-15042, 1997)。精製したSEAP融合タンパク質は、N末端アミノ酸シーケンシングに従属させた。

[0129] [ケラチノサイトのインビトロ分化]

集密に達していない正常ヒト表皮ケラチノサイトをHumedia KG2培地( $\text{Ca}^{2+}$ 濃度0.15mM、ウシ下垂体抽出物(BPE)を含む)皿中( $2.5 \times 10^3$ 個/ $\text{cm}^2$ )の密度で播き、2日間培養した。続いて細胞をそれぞれBPEを含まない、正常 $\text{Ca}^{2+}$ 培地( $\text{Ca}^{2+}$ 0.15mM)あるいは高 $\text{Ca}^{2+}$ 培地( $\text{Ca}^{2+}$  1.5mM)で何回か洗浄した。ケラチノサイトを次に正常 $\text{Ca}^{2+}$ 培地中で2、4および6日間、あるいは高 $\text{Ca}^{2+}$ 培地中で2日間培養した。qRT-PCRに用いるための全RNAを、RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いてこれらの細胞から調製した。また、トランスフェクションをする場合は、TransIT LT1 keratinocyte(Mirus)を用いて二日目の0.15mM  $\text{Ca}^{2+}$ で培養したケラチノサイトにトランスフェクトした。

[0130] [定量的リアルタイムRT-PCR分析]

マウス組織の定量的リアルタイムPCR分析のために、種々のマウス組織(8週齢雌Balb/cマウス)から、RNeasy Fibrous Tissue Miniキット(QIAGEN)を用いて全RNAを調製した。RNA PCRキット(AMV) Ver.2.1 (TAKARA、Shiga、Japan)をランダムな9量体プライマーとともに用いて、第一鎖cDNAテンプレートを総RNAから調製した。定量的リアルタイムPCRは、QuantiTect SYBR Green PCRキット(QIAGEN)およびABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster city, CA)で、SYBRGreen I色素の蛍光の増加を観測することによって二重化して行った。プライマーは、多数の転写物が同時に解析できるような単リアルタイムPCR熱プロフィール(95℃15分、および95℃15秒および60℃1分を40サイクル)に一致するようにデザインされた。全データは内部標準(グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ mRNA;  $\Delta \text{Ct}$  method、User Bulletin 2、Applied Biosystems)について標準化した。プライマーのセットは以下のとおりである。

[0131] マウスdermokine- $\alpha$  (AK003695)、順方向プライマー(5'-GACTGTACGAGAGCACCAACCATG-3' / 配列番号:25)および逆方向プライマー(5'-CTGAACCCCAGCTGTGGC-3' / 配列番号:26);



マウスdermokine- $\beta$  (AK081753)、順方向プライマー(5'

-CATGCCCCATCTCCCAGC-3' / 配列番号:27)および逆方向プライマー(5'

-CCCTCAATCTGTTTCCAGTTGAAG-3' / 配列番号:28);

マウスKdap(XM149907)、順方向プライマー(5'

-ACTGGCACGTCATCACTGATATGTTC-3' / 配列番号:29)および逆方向プライ

マー(5'-GGAATCAGGAGCGGCACTTC-3' / 配列番号:30);

マウスsuprabasin(AY115494)、順方向プライマー(5'

-GTCAACAAGCCATTTATCAACTTCC-3' / 配列番号:31)および逆方向プライマ

ー(5'-GTGTGACAACCGGAGCATTC-3' / 配列番号:32);

マウスGAPDH(NM008084)、順方向プライマー(5'

-AAGGTGGTGAAGCAGGCATCTGAG-3' / 配列番号:33)および逆方向プライマ

ー(5'-GGAAGAGTGGGAGTTGCTGTTGAAGTC-3' / 配列番号:34);

ヒトdermokine- $\alpha$  (AL832080)、順方向プライマー(5'

-ATGAACATGAAGCCGGCCAC-3' / 配列番号:35)および逆方向プライマー(5'

-CGTTTCTGCAGTGATGACGCG-3' / 配列番号:36);

ヒトdermokine- $\beta$  (BC035311)、順方向プライマー(5'

-AAAGGCCATTGGCAAAGAGGCC-3' / 配列番号:37)および逆方向プライマー

(5'-ACCCTGTTGCCCAAAGCATCTG-3' / 配列番号:38);

ヒトKdap(BX112106)、順方向プライマー(5'

-AACTGGCACGCCCTCTTTGAGTCTATC-3' / 配列番号:39)および逆方向プラ

イマー(5'-ATGGTCACTGGGCATCAGGAGTTG-3' / 配列番号:40);

ヒトsuprabasin(BC063640)、順方向プライマー(5'

-AACCAGCTGCTGAATGGCAACCA-3' / 配列番号:41)および逆方向プライマー

(5'-ATGAAAGGCGTGTTGACCGAGG-3' / 配列番号:42);

ヒトケラチン10 (J04029)、順方向プライマー(5'

-CTTGGCAGAAACAGAAGGTCGCTAC-3' / 配列番号:43)および逆方向プライ

マー(5'-CGGTTTCAGCTCGAATCTCTTGC-3' / 配列番号:44);

ヒトインボルクリン(M13903)、順方向プライマー(5'

-CCACCCAAACATAAATAACCACCCG-3' / 配列番号: 45) および逆方向プライマー(5'-TAGCGGACCCGAAATAAGTGGAGC-3' / 配列番号: 46);

ヒトTGase 1 (NM000359)、順方向プライマー(5'-ATGTCTCAGGCCACGTCAAG-3' / 配列番号: 47) および逆方向プライマー(5'-CTGCTCCCAGTAACGTGAGG-3' / 配列番号: 48);

ヒト  $\beta$ -actin (NM001101)、順方向プライマー(5'-ATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAG-3' / 配列番号: 49) および逆方向プライマー(5'-TGCTTGCTGATCCACATCTGC-3' / 配列番号: 50);

およびヒトGAPDH(NM002046)、順方向プライマー(5'-ACTTCAACAGCGACACCCACTC-3' / 配列番号: 51) および逆方向プライマー(5'-CCTGTTGCTGTAGCCAAATTCG-3' / 配列番号: 52)。

[0132] [マウス表皮において発現した遺伝子のハイスループットin situハイブリダイゼーションスクリーニング]

マウス皮膚切片のin situハイブリダイゼーション用にcRNAプローブを生成するために、本発明者らは8週齢雌Balb/cマウスの背中皮膚からcDNAライブラリーを調製し、上記実験手順に述べたように均一化した。均一化は、低レベルで転写される遺伝子を効率よく拾い上げるためのこのタイプのスクリーニングは必須である。cDNAライブラリーがうまく均等化されたかを確認するために、マウスのケラチン14(NM016958)、ケラチン5(NM027011)、インテグリン  $\alpha$ -M(NM008401)、およびロリクリン(NM008508)に対する遺伝子特異的プライマーで定量的リアルタイムPCRを、インテグリン  $\alpha$ -Mの発現レベルは比較的低いと思われるが、ケラチン14およびケラチン5は大量に発現されると思われる期待値で行った。cDNA鋳型間の量を標準化するため、ロリクリンcDNAの量はマウスロリクリンに対する特異的プライマーで決定した。図1Aに示すように、ライブラリーの均等化後、ケラチン14およびケラチン5の両方ともおよそ1/5に減少していたことが示された。対照的に、インテグリン  $\alpha$ -M量は、およそ42倍に増加していた。均等化効率についても、均等化の前後に、そのライブラリーから無作為に選択した500のクローンのDNA配列決定により評価した。クラスター解析から、非均等化および均等化ライブラリーについての予備的な重複性が、それぞれ35.3%および1.3%であ

った。これらの知見は、均等化方法が、非常に豊富なcDNA種の量、すなわちクローンの重複性(redundancy)がうまく減少したことを示す。

[0133] マウスの足蹠表皮は、背中の皮膚のような濾胞間の表皮よりも厚く、その形態はヒト表皮に似ている。従って本発明者らは、ハイスループットin situハイブリダイゼーション(HT-ISH)における遺伝子の層特異的発現を同定するために、マウス足蹠表皮(8週齢Balb/cマウス)切片を使用した。切片を96-ウェルプラスチックプレートの各ウェル(100プレート;計9600切片)上に配置した後、均等化cDNAライブラリーから調製したDIG-標識したcRNAプローブを、ハイブリダイズした。切片9600個の中で、およそ1000個でハイブリダイゼーションシグナルが認められた。

[0134] その後の配列決定によって、一600の重複したcDNAクローンが除かれ、独立した遺伝子が残った。本発明者らはこれらの遺伝子に対するin situハイブリダイゼーションの再現性について評価し、核染色したクローンを除外した後、マウス足蹠表皮の特異的な層において発現した116種の独自のクローンを最終的に選択した。これらのクローンはもちろん以前に十分に特徴付けがなされた遺伝子を含んでいた。シクロフィリンA、Kdap、プロチモシン $\alpha$ 、ジアゼパム結合インヒビター、チューブリン $\beta$ -2鎖ホモログ、ラミンA、核分布Cホモログ、デスモプラキン、ケラチン関連タンパク質16-5、ヌクレオシド二リン酸キナーゼC、スモールプロリンリッチ様2、およびロリクリンに対するHT-ISHシグナルは、例として図1Bに示した。以前の報告と同じく、シクロフィリンA、Kdap、およびロリクリンの発現はそれぞれ、基底層/基底層上、基底層上および顆粒層に局限した(AL-Daraji WI, Grant KR, Ryan K, Sacton A, Reynolds NJ:

Localization of calcinurin/ NFAT in human skin and psoriasis and inhibition of calcinurin/ NFAT activation in human keratinocytes by cyclosporin A. J. Invest. Dermatol. 118: 779-788, 2002.; Oomizu S, Sahuc F, Asahina K, Inamatsu M, Matsuzaki T, Sasaki M, Obara M, Yoshizato K: Kdap, a novel gene associated with the stratification of the epithelium. Gene. 256:19-27, 2000.; Mehrel T, Hohl D, Rothnagel JA, Longley MA, Bundman D, Cheng C, Lichti U, Bisher ME, Steven AC, Steinert PM et al.: Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. Cell 61:1103-1112, 1990.)。これらの発見はHT-ISHスクリーニングが上手く

行なわれたことを示すものである。

[0135] [有棘層において発現された新規遺伝子の同定]

本発明者らは、これらの116種のcDNAクローン中で、有棘層においてin situハイブリダイゼーションシグナルが特異的に検出された新規cDNA断片(SK063F08)を同定した(図2A)。その新規cDNAクローンの全長を得るために、マウスの公開された利用可能なESTデータベースを検索し、SK063F08の全配列を有するESTクローン(AK003695)を同定した(図2B)。マウス皮膚におけるAK003695の発現は、RT-PCRにより確認した。このAK003695 ESTは、22bpの短い5'-非翻訳領域(UTR)、アミノ酸104個のアミノ酸(配列番号:53)をコードしている315bpのオープンリーディングフレーム(ORF)、およびポリアデニル化シグナルを含む324bpの3'-UTRから構成されていた。

[0136] 更に、データベースで別のより長いEST(AK081753)を発見した。これは3'末端(98-657bp)でAK003695として同じ配列をシェアしていた。これは、これらのESTがスプライシングバリエーションであることを示している(図2B)。マウス皮膚におけるAK081753の発現も、RT-PCRにより確認された。AK081753に対応するいくつかのクローニングされたcDNAのヌクレオチド配列のclose examinationにより、AK081753の743bpの部分に1個のヌクレオチド欠失、1132bpと1133bpの間に27bpの挿入、及び1197-1244bpの間の48bpの欠失が同定された。補正したAK081753 EST配列は、170bpの短い5'-UTR、517アミノ酸のタンパク質をコードする1554bpのORF、およびポリアデニル化シグナルを含む320bpの3'-UTRを有していた(図2B)。

[0137] ヒトESTデータベースにおいて、マウスEST(AK003695およびAK081753)の各々に対して相同なふたつのEST(AL832080およびBC035311)を同定した(図2B)。これらはヌクレオチド配列レベルでおよそ63%および55%同一であり、アミノ酸配列レベルではいずれも54%同一であった(図2B、C)。開始コドン周辺のマウスおよびヒトESTであるAK003695、AK081753、AL832080およびBC035311に隣接する配列は、コザックにより提唱された翻訳開始部位と一致していた(Kozak, M: Nucleic Acids Res. 15:8125-8148, 1987.)。

[0138] AK003695、AK081753、AL832080およびBC035311の推定アミノ酸配列は、GenBankのあらゆる他の配列との類似性を示さなかった。dermokine- $\beta$ において、2



つの保存されたシステイン残基(図2C中の矢印)および保存された潜在的なN-グリコシレーション部位(図2C中の矢頭)、およびdermokine- $\alpha$  / - $\beta$  においていくつかの潜在的なN-ミリストイレーション部位があった。興味深いことに、SignalP serverは、これら全てのESTから推定されたアミノ酸配列から、それらのN-末端の典型的シグナル配列を推定した(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/#submission>)。更に2つのスプライシングバリエーション(splicing variant)によるC末側の共有部分は、非常に高いpI値を示し(pI=10.3; 図2B、Cおよび図4A参照)、これは骨形成タンパク質(BMP)、eotaxin、線維芽細胞増殖因子(FGF)、インターフェロン- $\beta$  (IFN- $\beta$ )、インターロイキン(IL)、血小板由来成長因子(PDGF)、Wntなどの様々なサイトカイン類において共通していた。従って以下に説明するように、これらのペプチドのmRNAは皮膚において大量に発現されていることを考慮して、本発明者らは暫定的に、短いおよび長いスプライシングバリエーションを、それぞれ「dermokine  $\alpha$  および  $\beta$  」と命名した(図2C)。

[0139] [dermokine -  $\alpha$  /  $\beta$  遺伝子の構成]

Ensembl Human Genome Browserは、染色体19q13.1上にヒトdermokine -  $\alpha$  および -  $\beta$  に対する遺伝子を位置づけ(ENSG00000161249)、それは $\sim$ 14-kbの範囲に広がっている。図3Aに示すように、ヒトdermokine- $\alpha$  および -  $\beta$  は、それぞれ6個および16個のエキソンからなる。興味深いことに、dermokine- $\alpha$  遺伝子のエキソン1は、推定翻訳開始部位およびシグナル配列の両方を有し、dermokine- $\beta$  遺伝子のエキソン11および12の間に存在し、それらは別のプロモーターによって転写されることを示唆している。推定終止コドンはdermokine- $\alpha$  のエキソン5、すなわちdermokine- $\beta$  のエキソン15内に含まれた。マウスのdermokine- $\alpha$  / -  $\beta$  遺伝子は、Ensembl Mouse Genome BrowserにおいてENSMUSG00000036665として、ヒトにおける19q13.1とシンテニーを共有した領域である染色体7上にマッピングされた。マウスdermokine- $\beta$  遺伝子の正確なゲノム構成は、入手可能なゲノムデータベース由来の情報が不完全であるために、決定されていないが、同じゲノム構成がマウスdermokine- $\alpha$  遺伝子座の周辺に確認された。

[0140] ヒト染色体19q13.1とマウス7番染色体において、dermokine遺伝子の両側にケラチノサイト-関連ペプチドであるsuprabasinおよびケラチノサイト分化-関連タンパク質

(Kdap)についてふたつの遺伝子が、マッピングされており(図3B):最近、両タンパク質は重層上皮において高度に発現されることが報告された(Oomizu S, Sahuc F, Asahina K, Inamatsu M, Matsuzaki T, Sasaki M, Obara M, Yoshizato K: Kdap, a novel gene associated with the stratification of the epithelium. *Gene*. 256:19-27, 2000.; Park GT, Lim SE, Jang S, Morasso MI: Suprabasin, a novel epidermal differentiation marker and potential cornified envelope precursor. *J. Biol. Chem.* 277:45195-45202, 2002.)。興味深いことに、suprabasin、dermokine- $\alpha$  / - $\beta$  および Kdap 遺伝子は、転写と同じ方向にこの順番で並んでいる。ケラチノサイト特異的タンパク質をコードしていない精巣特異的なグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼおよびユビキタスに発現するGPR43に対する遺伝子は、各々、suprabasinの上流およびKdapの下流に位置しているが(Welch JE, Schatte EC, O'Brien DA, Eddy EM: Expression of a glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene specific to mouse spermatogenic cells. *Biol. Reprod.* 46:869-878, 1992.; Sawazdargoら、1997)、しかしこれらの遺伝子は、suprabasin、dermokine- $\alpha$  / - $\beta$  およびKdapとは反対方向に転写される。これらの知見、すなわちケラチノサイト-関連遺伝子の新規クラスターが存在するということは、suprabasin、dermokine- $\alpha$  / - $\beta$  およびKdap mRNAの転写が、同調された方法で調節されることを示唆している。

[0141] [dermokine- $\alpha$  / - $\beta$ 、Kdapおよびsuprabasinの分泌]

図4Aに示したように、SignalP serverは、dermokine- $\alpha$  / - $\beta$  のみではなく、Kdapおよびsuprabasinも、それらのN-末端に推定シグナル配列を有すると推定した(図4A)。これは、以前にKdapにおいて指摘されており(Oomizu S, Sahuc F, Asahina K, Inamatsu M, Matsuzaki T, Sasaki M, Obara M, Yoshizato K: Kdap, a novel gene associated with the stratification of the epithelium. *Gene*. 256:19-27, 2000.)、一方suprabasinのN-末端疎水性配列は、潜在的な膜貫通ドメインとして考えられている(Park GT, Lim SE, Jang S, Morasso MI: Suprabasin, a novel epidermal differentiation marker and potential cornified envelope precursor. *J. Biol. Chem.* 277:45195-45202, 2002.)。しかし、dermokine- $\alpha$  / - $\beta$ 、Kdapおよびsuprabasin遺伝子は、遺伝子複合体を形成するので、それらの産物の全てがケラチノサイトから分泌

されると推測したくなる。この考えを試験するために、ヒトdermokine- $\alpha$  / - $\beta$ 、Kdapおよびsuprabasin (0.7-kb転写産物)cDNAを、哺乳類の発現ベクターpcDNA3.1-SEAP(His)<sub>6</sub>に挿入し、それらのC-末端をSEAP(His)<sub>6</sub>でタグ付けした融合タンパク質を発現させた。これらの融合タンパク質は、培養した293/EBNA-1細胞において一過性に発現し、培養培地において、抗-His抗体を使用するイムノブロッティングにより検出された(図4B)。興味深い点は、SDS-PAGEゲルにおいて、培地において検出された細胞は、融合タンパク質の推定分子質量と比べ、上側に有意にシフトしていたことであり、このことは、分泌されたタンパク質が、グリコシル化および／または分子間ジスルフィド結合によって、もしかすると翻訳後修飾されたことを示唆している。

[0142] 次に、N-末端推定シグナル配列が、これらの分泌された融合タンパク質において取り除かれているかどうかを調べた。分泌された融合タンパク質は各々、TALON Superflow Metal Affinity Resinにより培養培地から単一のバンドとして精製された(図4C): 本試験に用いたトランスフェクション条件および培養条件では、dermokine- $\alpha$ -SEAP(His)<sub>6</sub>、dermokine- $\beta$ -SEAP(His)<sub>6</sub>、Kdap-SEAP(His)<sub>6</sub>、およびsuprabasin-SEAP(His)<sub>6</sub>は各々、収量0.15mg/L、0.3mg/L、13.5mg/L、および15mg/Lで精製された。これらの精製タンパク質のN-末端を直接アミノ酸配列決定したところ、これらの分泌タンパク質は、正確には図4Aにおいて予測されたような推定N-末端シグナル配列を欠いていることが明らかになった(図4C)。これらの知見は、dermokine- $\alpha$  / - $\beta$ 、Kdapおよびsuprabasinは、それらのN-末端において切断され、更に翻訳後修飾を受け、その結果分泌されたことを示している。

[0143] [組織におけるdermokine  $\alpha$  および  $\beta$ 、Kdapならびにsuprabasinの発現パターン]  
様々なマウス組織におけるdermokine- $\alpha$  /  $\beta$ 、Kdapおよびsuprabasin転写産物の発現を、ノーザンブロットにより試験した(図5A)。dermokine- $\alpha$  および- $\beta$  の両方にハイブリダイズするSK063F08プローブ(図2B参照)は、皮膚においては強く、胃においては弱いふたつのバンド0.6kbおよび2.0kbを検出した(Dermokine- $\alpha$  /  $\beta$ 、図5A); 長期間曝露した場合、これらのバンドは、肺においても検出された(データは示さず)。それらの大きさから判断して、これらのバンドは、それぞれdermokine- $\alpha$  と- $\beta$  に対応して

いると考えられる。実際、dermokine- $\beta$ -特異的プローブ( $\beta$ -プローブ、図2B)を使用したところ、2.0-kbバンドのみを検出した(Dermokine- $\beta$ 、図5A)。Kdapは、胃および皮膚において大量に発現され、肺において少量発現された(Kdap、図5A)。

suprabasin遺伝子の0.7-kbおよび2.2-kbスプライシングバリエーションの発現パターンは、dermokine- $\alpha$  / - $\beta$  のそれと非常に類似していた(Suprabasin 図5A)。更に、本発明者らは、定量的RT-PCR(qRT-PCR)により、これらのタンパク質の発現を調べた(表1)。

[0144] 表1は、様々な上皮組織におけるdermokine- $\alpha$ 、- $\beta$ 、Kdapおよびsuprabasinの発現を定量的リアルタイムRT-PCRで解析した結果を示す。総RNAは8週齢雌Balb/cマウスからの様々な上皮組織から調整し、マウスdermokine- $\alpha$ 、- $\beta$ 、Kdap、およびsuprabasinに特異的なプライマーを用いてSYBR Greenベース定量的リアルタイムRT-PCRを行なった。全データは内部GAPDH mRNA対照について標準化した。GAPDH ( $\times 10^{-3}$ )に対する比:- = 0~0.1; + = 0.1~1; ++ = 1~10; +++ = 10~100; ++++ = 100~1000; +++++ = 1000~2000; ++++++ = 2000~3000。

[0145] [表1]

組織	Dermokine- $\alpha$	Dermokine- $\beta$	Kdap	Suprabasin
背中皮膚	+++	++++	+++	+++
足趾皮膚	++++	+++++	++++	++++
舌	+++	++++	+++	+++
食道	+++	++++	++++	+++
前胃部	++++	+++++	+++++	++++
腺胃	++	++	++	+
膈	+++	+++	+++	++
気管	++++	+++	++	++
肺	+++	+++	-	++
膀胱	+	+	+	+
胸腺	++	++	+	+
小腸	-	-	-	-
肝臓	-	-	-	-

[0146] これはノーザンブロットの結果と非常に良く一致し、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$ 、Kdapおよびsuprabasinは、皮膚、舌、食道、前胃部、および膈などの重層上皮において大量に発現していた。これらは、気管および膀胱、更には胸腺において発現され、このことは、



Kdapが気管および膀胱で発現され、suprabasinは胸腺で発現されたという報告(Oomizu, S., Sahuc, F., Asahina, K., Inamatsu, M., Matsuzaki, T., Sasaki, M., Obara, M., Yoshizato, K. (2000) Gene 256, 19-27、Park GT, Lim SE, Jang S, Morasso MI: J. Biol. Chem. 277:45195-45202, 2002)と一致している。たとえRT-PCRであっても、肝臓や小腸のような典型的単層上皮においては、これらは検出不可能であった。従って、dermokine- $\alpha/\beta$ 、Kdapおよびsuprabasinは、若干の例外はあるものの重層上皮特異的に分泌されるタンパク質であると本発明者らは結論付けた。この結論は、染色体上で複合体を形成しているこれらの遺伝子の発現は、重層上皮に特異的方式で調和を持って調節されているという注目点に一致している。従って本発明者らはここで、この遺伝子複合体は、SSC(重層上皮分泌ペプチド複合体(stratified epithelium secreted peptides complex))と称することを提唱する。

[0147] 次に本発明者らは、重層上皮内で、SSC産物の発現を、詳細に比較し、マウス足蹠表皮の連続切片について、in situ ハイブリダイゼーション解析を行った。8個の表皮の連続切片を、dermokine- $\alpha/\beta$ 、KdapおよびsuprabasinについてのアンチセンスまたはセンスcRNAプローブとハイブリダイズした。図5Bに示したように、dermokine- $\alpha/\beta$  (SK063F08、図2B)、dermokine- $\beta$  プローブ( $\beta$  probe、図2B)およびsuprabasinのアンチセンスプローブは、表皮有棘層を通じて均等に、ハイブリダイゼーションシグナルを生じた。対照的に、Kdap-特異的プローブは、先にOomizuらが報告したように、専ら有棘層の基底上部にハイブリダイズした(Oomizu S, Sahuc F, Asahina K, Inamatsu M, Matsuzaki T, Sasaki M, Obara M, Yoshizato K: Kdap, a novel gene associated with the stratification of the epithelium. Gene. 256:19-27, 2000.)。これらの結果は、SSC産物の発現は、表皮内におけるケラチノサイト(keratinocyte)が重層化分化を開始する際に活性化されたことを示唆している。

[0148] [SSC 産物およびケラチノサイト分化]

胚の発生時におけるdermokine- $\alpha/\beta$  の発現を、SK063F08プローブを使用し、ノーザンブロットにより試験した。図6Aに示したように、dermokine- $\beta$  は、E15.5で発現され始め、この時期は、表皮層化とほぼ同時である。dermokine- $\alpha$  は、E16.5で検出可能であり、E17.5まで増加し、E18.5までに減少する。これらの知見は、dermokine-

$\alpha/\beta$  は、マウス発生初期において、in vivoにおける表皮の重層化に関連していることを示唆している。

- [0149] 最後に、SSC産物とケラチノサイト分化の間の関係を更に試験するために、初代培養ヒトケラチノサイトのin vitro分化の期間のSSC産物発現レベルの変化を、qRT-PCRにより追跡した。この分化は、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇(0.15mMから1.50mM)によるか、または0.15mM  $\text{Ca}^{2+}$ での細胞密度の上昇(2日間培養から6日間培養)により、誘導された。ヒトケラチノサイトにおいて、後者の方法は、終末分化の誘導に関してより有効であることが報告されており(Poumay Y, Pittelkow MR: Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. J. Invest. Dermatol. 104:271-276, 1995.)、このことは、qRT-PCRにより、ケラチン10、TGase 1、およびインボルクリンのmRNAレベルを測定することにより確認された(図6B)。興味深いことに、SSC産物の発現は全て、終末分化がin vitroにおいて進行している限りは、明確に誘導された。

- [0150] [Dermokine- $\alpha$  がケラチノサイトの分化に及ぼす影響]

次にケラチノサイトの分化にDermokine- $\alpha$  が及ぼす影響を調べた。12 well dish中に0.15mM  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で、2500 cells/cm<sup>2</sup>で培養したケラチノサイトに対して、ヒトDermokine- $\alpha$  のC末端側にHA-tagをつけたcDNAを一過性にtransfectionにより発現させた。その結果、6日後にtotal RNAを回収すると、Dermokine- $\alpha$  を発現させたケラチノサイトはMockに比べて、有意にtotal RNAの回収量が低かった(図7A)。この事は、増殖が抑制されていることを示唆している。

また、重層上皮の分化マーカーである、インボルクリンに対するプライマーでそのようなRNAからqRT-PCR法によりその発現量をGAPDHを標準として定量したところ、Mockに比べて、有意に上昇していた(図7B)。この事はDermokine- $\alpha$  の発現によりケラチノサイトの分化が促進された事を示唆した。以上の事から、Dermokine- $\alpha$  はケラチノサイトの増殖、分化の遂行に重要な役割を果たす事が示唆された。

- [0151] [SSCタンパク質群に対する抗体の作成]

ヒトdermokine- $\alpha$ 、 $-\beta$ 、Kdap、Suprabasinに対するウサギポリクローナル抗体を作成する為に図4で用いた、pcDNA3.1-SEAP(His)<sub>6</sub> vectorにヒトdermokine- $\alpha$ 、Kdap、

Suprabasinを導入したもの、及び、Dermokine- $\beta$  から、dermokine- $\alpha$  との共通部分を欠失したもの (dermokine- $\beta$  - $\Delta$  C) を作成し (図8A)、293/EBNA-1において一過性に発現させた。得られた培養培地からTALON Superflow Metal Affinity Resinにより、単一のバンドとして精製した (図8B)。これらの融合タンパク質をウサギに免疫し、抗血清を得た。得られた抗血清を用いて、同じく293/EBNA-1に一過性にヒト dermokine- $\alpha$ 、- $\beta$ 、- $\beta$  - $\Delta$  C、Kdap、Suprabasinを発現させた培養上清に対して immunoblotを行った。その結果、抗血清はこれらの四種類のタンパク質に対して反応する事が明らかとなった (図8C)。

[0152] [モノクローナル抗体の作製]

モノクローナル抗体の抗原を作製する為に、pcDNA3.1-SEAP(His)<sub>6</sub> ベクターにヒト/マウスdermokine- $\beta$  のC末欠損型 (dermokine- $\beta$   $\Delta$  C) cDNAを挿入した発現ベクターを、293/EBNA-1に導入し一過性に発現させた。得られた培養上清からTALON Superflow Metal Affinity Resinにより、ヒト/マウスdermokine- $\beta$   $\Delta$  C-SEAP(His)<sub>6</sub> 蛋白質を精製した。この融合蛋白質をヒトdermokine- $\beta$   $\Delta$  C-SEAP(His)<sub>6</sub> はマウス (Balb/C female) に、マウスdermokine- $\beta$   $\Delta$  C-SEAP(His)<sub>6</sub> はラット (Wister rat female) に免疫し、モノクローナル抗体 (それぞれAnti-hDK mAb, Anti-mDK mAbと称す) を作製した。

[0153] [293細胞培養上清のImmunoblotting]

293細胞で発現させたヒト及びマウスdermokine- $\beta$  /- $\beta$   $\Delta$  Cをimmunoblotにより解析した。

pcDNA3.1-human dermokine- $\beta$ 、pcDNA3.1-human dermokine- $\beta$   $\Delta$  C、pcDNA3.1-mouse dermokine- $\beta$ 、pcDNA3.1-mouse dermokine- $\beta$   $\Delta$  Cを293/EBNA-1細胞にtransfectionし、得られた培養上清をSDS-PAGEに供し、ニトロセルロース膜へtransferした。その膜にAnti-hDK mAb, Anti-mDK mAbを反応させて immunoblotを行った。

結果を図9右 (マウス) 及び図9左 (ヒト) に示すCBBでは培養上清中の多くの蛋白質が染色されたが、immunoblotでは80kDa付近に特異的にバンドが検出され、Anti-hDK mAb, Anti-mDK mAbはそれぞれ、dermokine- $\beta$  /- $\beta$   $\Delta$  Cを特異的に認識した。

## [0154] [DermokineのELISA]

ELISA用96穴マイクロプレート(Nunc社製)の各ウェルにPBSで希釈した $2\mu\text{g/ml}$ の抗ラットIgGポリクローナル抗体を $50\mu\text{l}$ 加え、 $37^\circ\text{C}$ で1時間インキュベートし、マイクロプレートに吸着させた。ポリクローナル抗体溶液を除き、次いで各ウェルにブロッキング試薬(Block-Ace、大日本製薬株式会社製)を $100\mu\text{l}$ 加えて、室温で1時間インキュベートし抗体が結合していない部分をブロックした。各ウェルを、 $0.02\%$  Tween20を含むリン酸緩衝液( $0.02\%$  T-PBS)で1回洗浄し、作製したAnti-hDK mAb及びAnti-mDK mAb(ハイブリドーマ無血清培養上清)を $50\mu\text{l}$ 加え、室温で1時間インキュベートした。各ウェルの溶液を捨て、 $0.02\%$  T-PBSで3回洗浄して抗体を固相化した。

次に各ウェルに $65^\circ\text{C}$ 、10分処理を行い、PBSで希釈した、 $6.25\sim 50\text{ nM}$ のヒト/マウスdermokine- $\beta$ -SEAP(His)<sub>6</sub>もしくはヒト/マウスdermokine- $\beta$   $\Delta$  C-SEAP(His)<sub>6</sub>  $50\mu\text{l}$ を加え、室温で1時間インキュベートした。マイクロプレートを $0.02\%$  T-PBSで5回洗浄して、AURORA AP Chemiluminescent Reporter Gene Assay Kit (ICN)を用いて、固相化抗体に結合したヒト/マウスdermokine- $\beta$ -SEAP(His)<sub>6</sub>もしくはdermokine- $\beta$   $\Delta$  C-SEAP(His)<sub>6</sub>のアルカリフォスファターゼ活性を検出した。反応液は1420 ARVO マルチラベルカウンター、Wallac1420 Managerにて $460\text{nm}$ で測定した。

図10A(マウス)及び図10B(ヒト)に、dermokine- $\beta$ -SEAP(His)<sub>6</sub> (—●—)もしくはdermokine- $\beta$   $\Delta$  C-SEAP(His)<sub>6</sub> (—○—)を結合させた結果を示した。固相化したAnti-hDK mAb, Anti-mDK mAbは共に濃度依存的にdermokine- $\beta$ に結合した。なお、SEAPのみのrecombinant蛋白質は殆ど固相化した抗体には結合しなかった。

[0155] [組換えヒトdermokine- $\beta$ /demokine- $\beta$   $\Delta$  Cの精製]

pcDNA3.1-human dermokine- $\beta$ 、pcDNA3.1-human dermokine- $\beta$   $\Delta$  Cを293/EBNA-1細胞にtransfectionし、得られた培養上清(培地:Opti-MEM I; GIBCO)にNaClを終濃度 $0.5\text{ M}$ となるように加え、 $0.5\text{ M}$  NaClを含む $20\text{ mM}$  HEPES(pH 7.5)緩衝液で平衡化したLentyl Lectin Sepharose 4B(アマシャム・バイオサイエンス社製)ビーズに通してタンパク質を吸着させた。その後 $1\text{ M}$  NaClを含む $20\text{ mM}$  Tris-HCl(pH 7.5)で非特異的吸着タンパク質を洗浄した後、 $20\text{ mM}$  Tris-HCl(pH 7.5)でさらに洗浄し、 $1\text{ M}$  メチル- $\alpha$ -D-マンノピラノシド( $\alpha$ -MM)、 $0.6\%$  CHAPSを含む $20\text{ mM}$



Tris-HCl (pH 7.5) で結合タンパク質を溶出した。次に、この溶出液を0.6% CHAPSを含む20 mM Tris-HCl (pH 7.5) で平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィーであるHiTrap Q HPカラム (アマシャム・バイオサイエンス社製) に供し、同緩衝液で洗浄後、0〜0.2 M NaClの濃度勾配で溶出した。カラム操作は、AKTAexplorer10Sシステム (P-903ポンプ、UV-900モニター、pH/C-900モニター、Frac-901フラクションコレクター; アマシャム・バイオサイエンス社製) を用いて4°Cにて行った。各フラクション中のタンパク質を15%のアクリルアミドゲルでSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行い分離した。電気泳動後のゲルは、硝酸銀による染色 (2D-銀染色試薬・II「第一」キット; 第一科学薬品社製) でタンパク質バンドを明視化した。またニトロセルロース膜に転写したタンパク質バンドに対しAnti-hDK mAbを反応させて (イムノブロット)、フラクション11〜23にヒトdermokine- $\beta$  及びヒトdermokine- $\beta$   $\Delta$  Cの溶出を確認した。

各段階 (培養上清: CM、Lentyl Lectin Sepharose 4B: Lentyl Lectin、HiTrap Q HPカラム: Q) の銀染色像と、Anti-hDK mAbによるimmunoblot像を示した (図11)。dermokine- $\beta$  はdoubletのバンドが検出されたが (図11左)、demokine- $\beta$   $\Delta$  C (図11右) はsingleバンドで検出された。

### 産業上の利用可能性

- [0156] 本発明により、SSCが、多層化された上皮において発現され、かつ分化特異的様式で誘導されることが示された。したがって、SSCが上皮ケラチノサイトの分化および／または増殖に関与することが考えられる。dermokineノックアウトマウスの作出により、SSCの正確な生理的役割を検討することができる。加えてこの遺伝子は、皮膚および他の多層化された上皮の疾患の特徴決定における新規マーカーとして利用され得る。

## 請求の範囲

- [1] 下記(a)～(d)のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
- (a) 配列番号: 2、4、6または8のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド
- (b) 配列番号: 1、3、5または7のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド
- (c) 配列番号: 2、4、6または8のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ケラチノサイトに発現させることにより該ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド
- (d) 配列番号: 1、3、5または7のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、ケラチノサイトに発現させることにより該ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド
- [2] ケラチノサイトの分化または増殖に関与する遺伝子であって、分泌タンパク質をコードする請求項1に記載のポリヌクレオチド。
- [3] 請求項1または2に記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド。
- [4] 請求項1または2に記載のポリヌクレオチドが挿入されたベクター。
- [5] 請求項1もしくは2に記載のポリヌクレオチド、または請求項4に記載のベクターを保持する宿主細胞。
- [6] 請求項5に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から、産生させたポリペプチドを回収する工程を含む、請求項3に記載のポリペプチドの製造方法。
- [7] 共通の遺伝子発現調節下にあることを特徴とする遺伝子複合体であって、(1) Kdap遺伝子、(2) dermokine- $\alpha$  遺伝子、(3) dermokine- $\beta$  遺伝子、および(4) suprabasin遺伝子の各遺伝子から構成されるケラチノサイトの分化または増殖に関与する遺伝子複合体。
- [8] 請求項1または2に記載のポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするポリヌクレ

オチドであって、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を持つポリヌクレオチド。

- [9] 請求項1もしくは2に記載のポリヌクレオチドまたはその一部に対するアンチセンスポリヌクレオチド。
- [10] 請求項3に記載のポリペプチドに結合する抗体。
- [11] dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質を有効成分として含む、ケラチノサイト分化誘導剤。
- [12] 以下の(a)ー(d)からなる群より選択される化合物を含む、ケラチノサイト分化抑制剤。
- (a) dermokine- $\alpha$  遺伝子もしくはdermokine- $\beta$  遺伝子の転写産物に対するアンチセンス核酸
  - (b) dermokine- $\alpha$  遺伝子もしくはdermokine- $\beta$  遺伝子の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有する核酸
  - (c) dermokine- $\alpha$  遺伝子もしくはdermokine- $\beta$  遺伝子の発現を、RNAi効果による阻害作用を有する核酸
  - (d) dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質と結合する抗体
- [13] 以下の工程(a)ー(c)を含む、ケラチノサイト分化誘導剤のスクリーニング方法。
- (a) dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質を発現する細胞と、被検化合物を接触させる工程
  - (b) 該細胞におけるdermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質の発現量または活性を測定する工程
  - (c) 被検化合物を接触させない場合と比較して、前記発現量または活性を上昇させる化合物を選択する工程
- [14] 以下の工程(a)ー(c)を含む、ケラチノサイト分化抑制剤のスクリーニング方法。
- (a) dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質を発現する細胞と、被検化合物を接触させる工程
  - (b) 該細胞におけるdermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質の発現量または活性を測定する工程
  - (c) 被検化合物を接触させない場合と比較して、前記発現量または活性を低下させ

る化合物を選択する工程

[15] 以下の工程(a)ー(c)を含む、ケラチノサイト分化誘導剤のスクリーニング方法。

(a) dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質、またはそれらを発現する細胞と、ケラチノサイト及び被検化合物を共存させる工程

(b) ケラチノサイトの重層上皮細胞への分化を測定する工程

(c) 被検化合物を共存させない場合と比較して、重層上皮細胞への分化を上昇させる化合物を選択する工程

[16] 以下の工程(a)ー(c)を含む、ケラチノサイト分化抑制剤のスクリーニング方法。

(a) dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質、またはそれらを発現する細胞と、ケラチノサイト及び被検化合物を共存させる工程

(b) ケラチノサイトの重層上皮細胞への分化を測定する工程

(c) 被検化合物を共存させない場合と比較して、重層上皮細胞への分化を低下させる化合物を選択する工程

[17] 以下の工程(a)および(b)を含む、被検細胞について、重層上皮から派生した癌細胞か否かを検査する方法。

(a) 被検細胞について、dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質の発現量または活性を測定する工程

(b) 対照と比較して、前記発現量または活性が変化している場合に、被検細胞は重層上皮から派生した癌細胞であるものと判定する工程

[18] 以下の工程(a)および(b)を含む、被検者について、扁平上皮癌または基底細胞癌の診断方法。

(a) 被検者から調製された細胞試料について、請求項17に記載の方法により、重層上皮から派生した癌細胞か否かを判定する工程、

(b) 前記工程により、重層上皮から派生した癌細胞であるものと判定された場合に、被検者は、扁平上皮癌または基底細胞癌に罹患しているものと判定する工程

[19] 以下の工程(a)および(b)を含む、被検者について、皮膚疾患の診断方法。

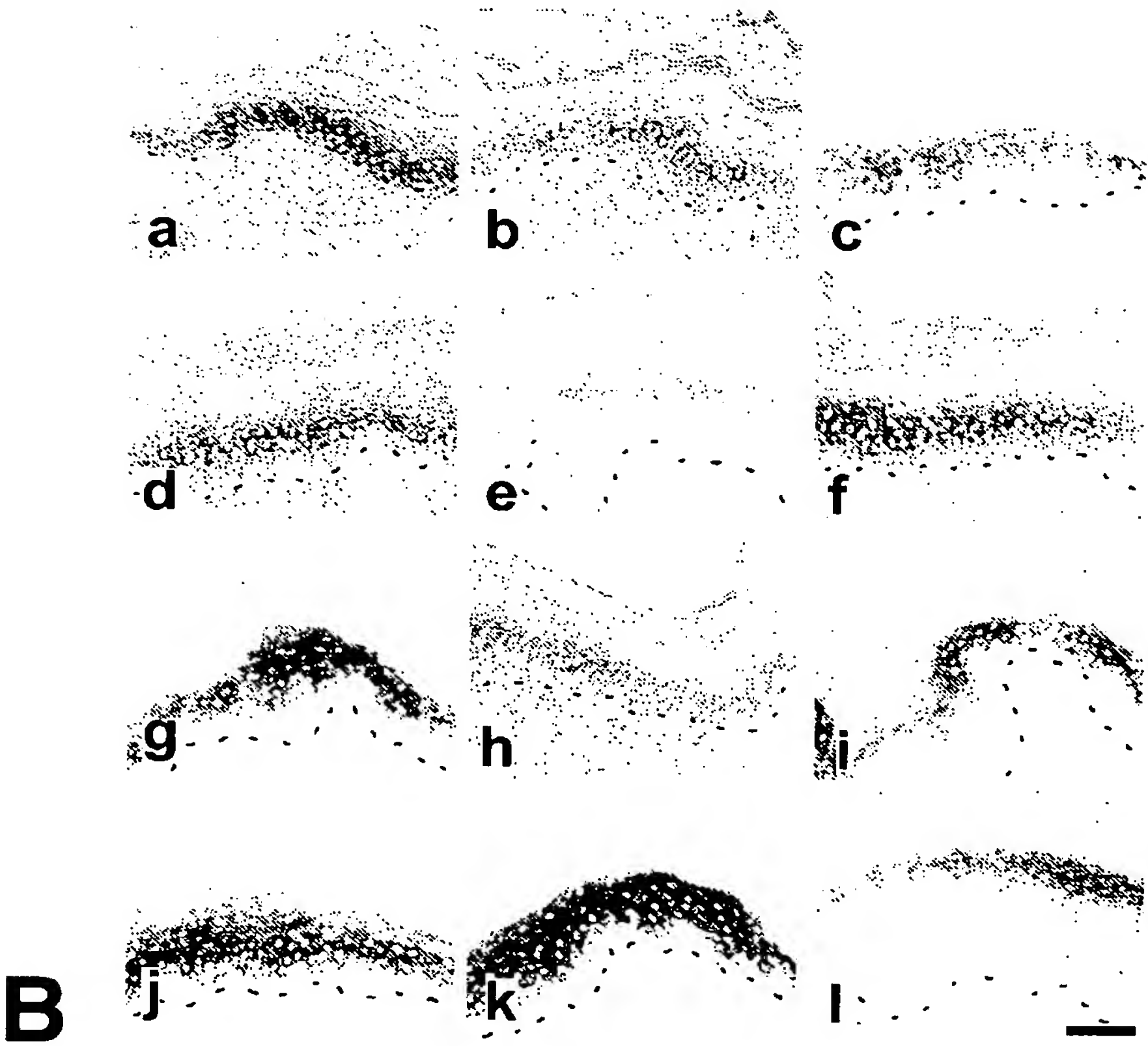
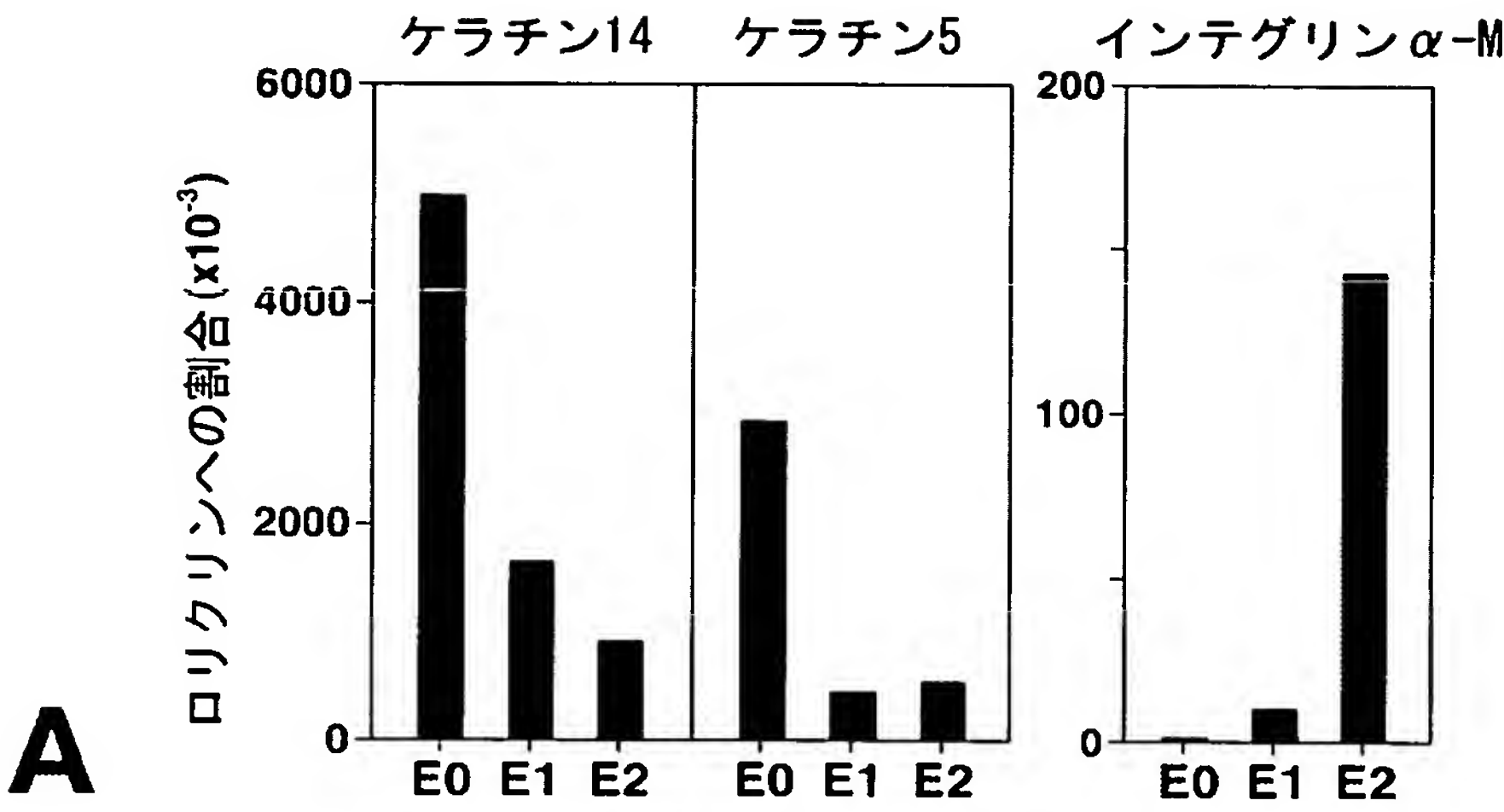
(a) 被検者から調製された被検試料について、dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質の発現量または活性を測定する工程



(b) 対照と比較して、前記発現量または活性が変化している場合に、被検者は皮膚疾患に罹患しているものと判定する工程

[20] 皮膚疾患が乾皮症、乾癬、または魚鱗癬である、請求項19に記載の診断方法。

[図1]



[図2-AB]

HE

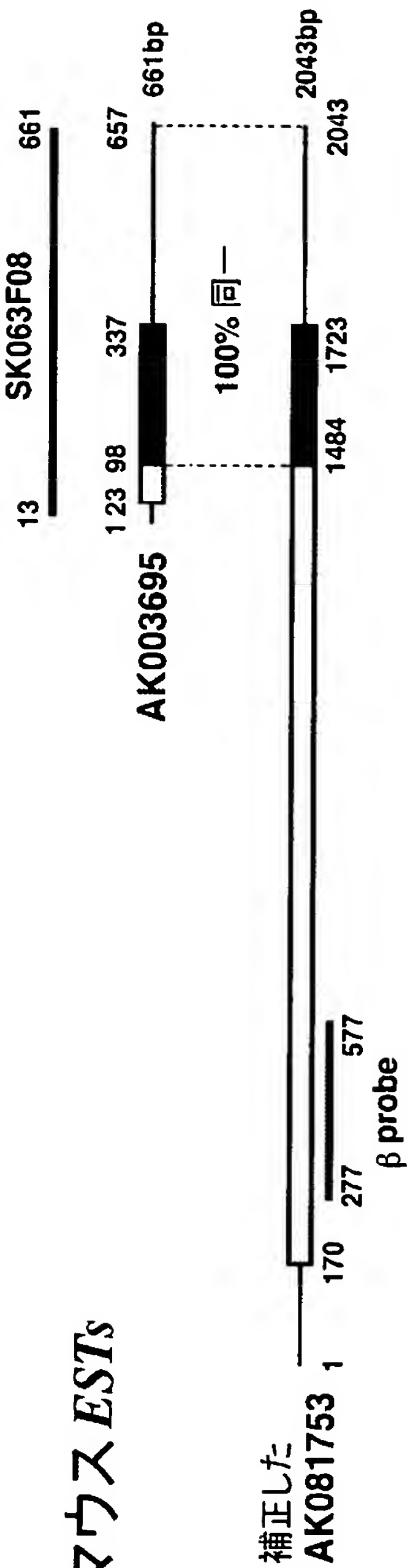
Antisense (SK063F08)

Sense (SK063F08)

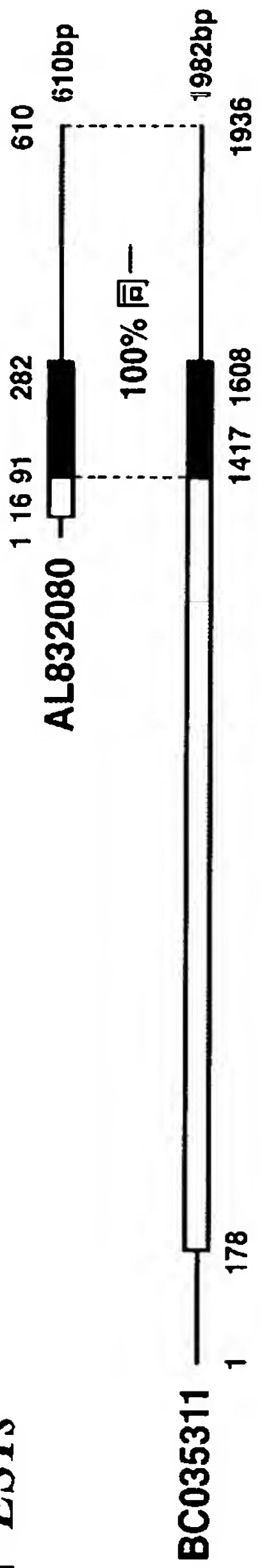


A

マウス *ESTs*



ヒト *ESTs*

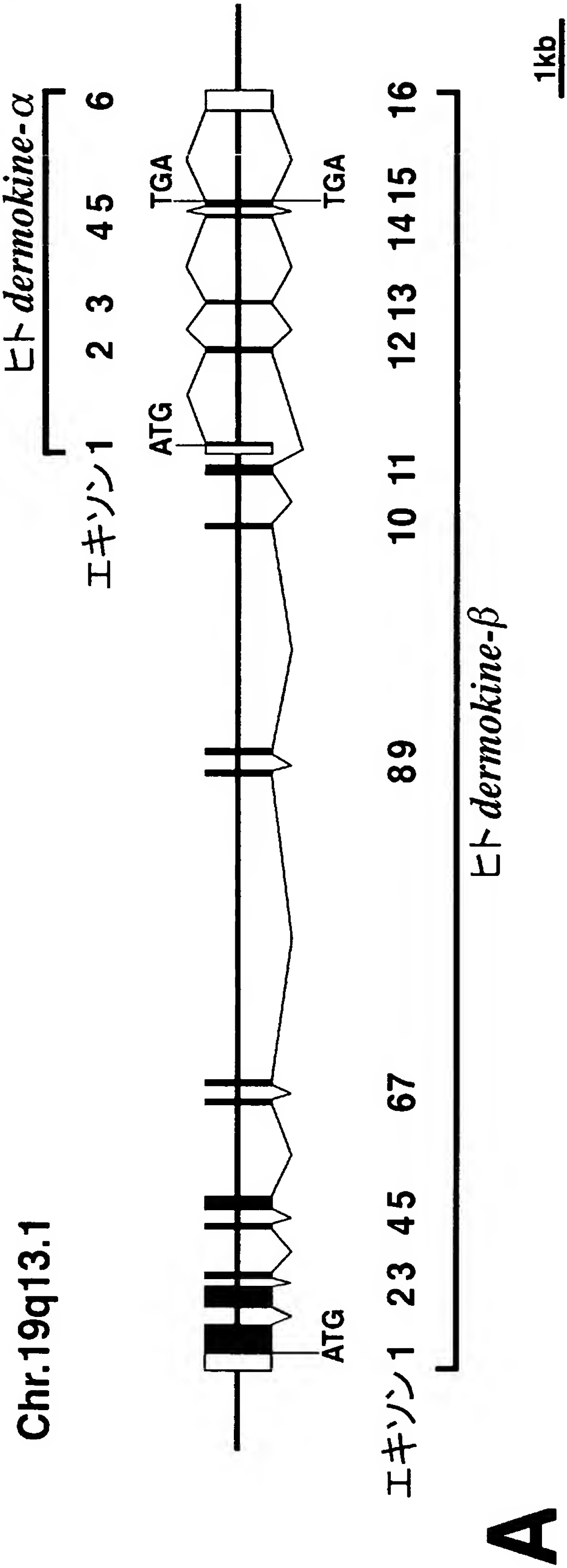


B

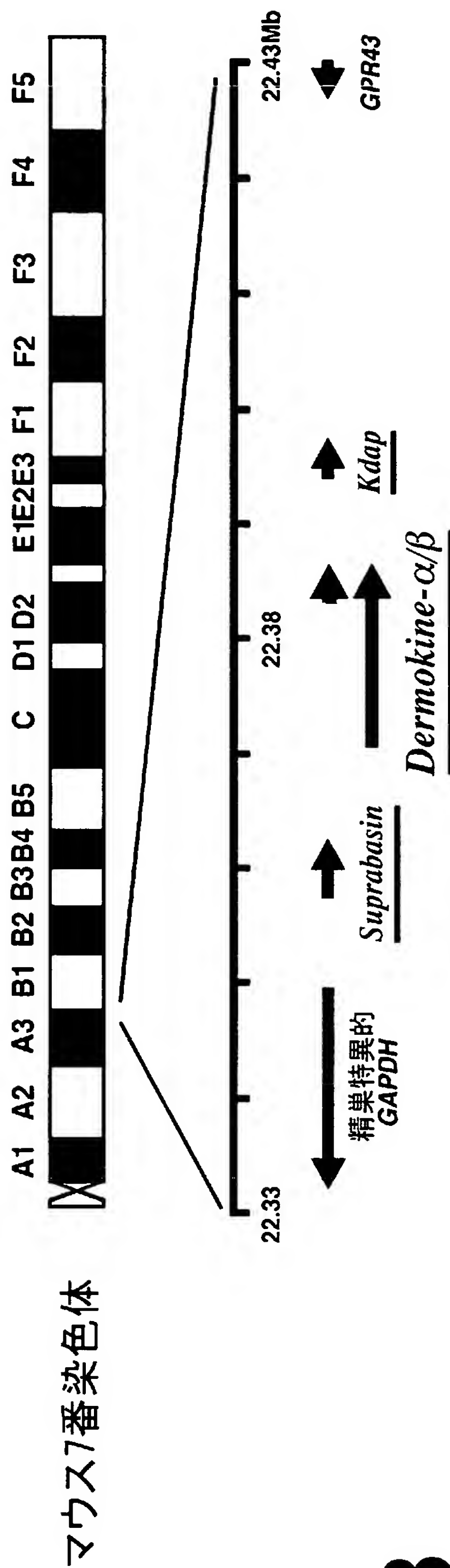
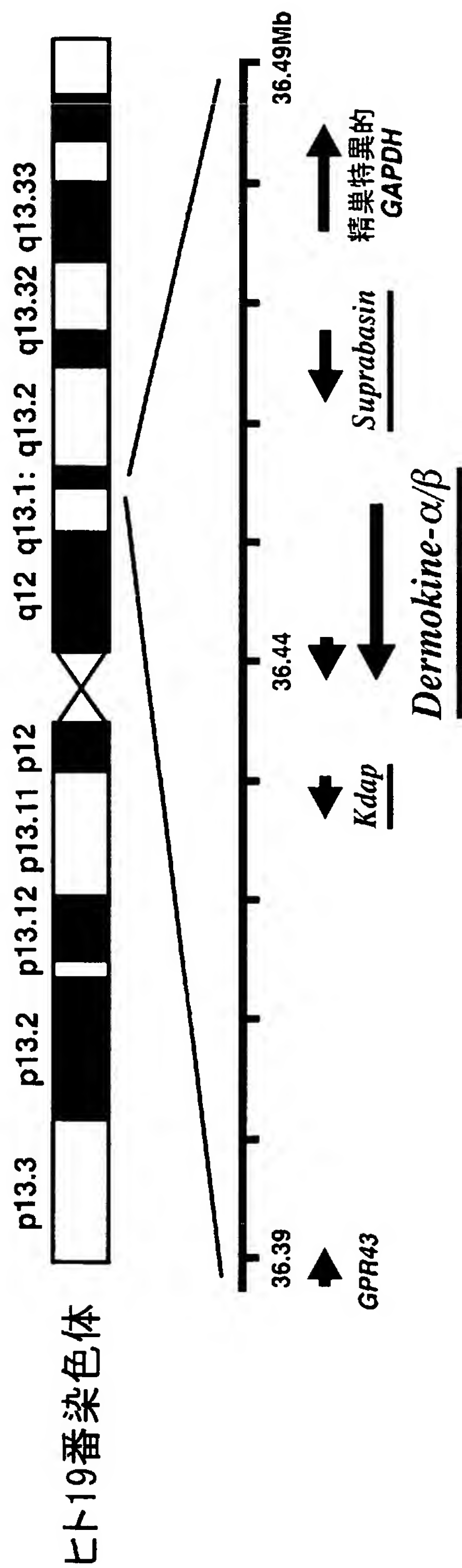
マウス	1	MKPVTASALLLILLGVAWRGD <sup>SHSW</sup>	GSDLSSLQKRAGGADQF <sup>SKPEARQDLSADSSKNYY</sup>	60
ヒト	1	MKPATASALLLLLGLAWTQG <sup>SHGW</sup>	GADASSLQKRA-G-----RAD--QNY-----N-Y	45
		*** ***** *	* ** *	
マウス	61	NNQQVNPTYNWQYYTKTTAKAGVTPSSSSASRAQPGLLKWLKFW		104
ヒト	46	NQHAYPTAYGGKYSVKTPAKGGVSP-SSSASRVQPGLLQWVKFW		88
		* * * * *	*	
<b>Dermokine-β</b>				
マウス	1	MKLQGS <sup>LACLLALCLGGGAANPLHSGGEGTGA--S-A-AHGAGDAISHGIGEAVGQGAKEAG</sup>		56
ヒト	1	MKFQGPLACLLALCLGS <sup>GEAGPLQSGEESTGTNIGELGHGLDALSEGVGKAIGKEAG</sup>		60
		** * * * * *	* * * * *	
マウス	57	EAASSGIQNALGQG-HGEEG-G-STLMG-SRGDVFEHRLGEAARSLGNAGNEIGRQAEDI		112
ヒト	61	GAAGSKVSEALGQGTREAVGTGVRQVPFGAADALGNRVGEAAHALGNTGHEIGRQAEDV		120
		* * * * *	* * * * *	
マウス	113	IRQGVDAV----H----NAGSWGTS <sup>GHHGAYGSQGG-AG-VQGNPGPQCTPW--A-SG--</sup>		157
ヒト	121	IRHGADA <sup>V</sup> RGSWQGVPGHN <sup>AWETSGHHGIFGSQGG</sup> LGGQ <sup>QGNPGGLGTPWVHGYPGNS</sup>		180
		** * * *	* * * * *	
マウス	158	-GNYGTNSLGGSVGQGGNGG <sup>PLNYETNAQGA</sup> VAPGYGT <sup>VRGNNQN</sup> SGCTNP <sup>PPSGSHES</sup>		216
ヒト	181	AGSFGMNPQ <sup>GAPWGQGGNGGPPNF</sup> GTNTQGA <sup>VAPGYGS</sup> VRASNQNEGCTNP <sup>PPSG----</sup>		236
		* * * * *	* * * * *	
マウス	217	FSNSGGSSNDGSRGSQGS <sup>HSGSNQGSSSGRGGGQGN</sup> SDNNGSSSSSSG <sup>SNSGNSNSGNSGN</sup>		276
ヒト	237	-S-GGGSSNSG--G--GS- <sup>GSQS-GSSG-SGSNGD-N</sup> NGSSS--GGSSSGSSSG <sup>GSSGG</sup>		284
		* * * * *	* * * * *	
マウス	277	SNSGNSGNSGSGSRDIETS <sup>NFDEGYSVSRGTGSRGSGGSGGSGGSGGSGG</sup> GNKPEC		336
ヒト	285	SSGSSGNSG-GSRG-D <sup>SGS--E--S-SWG-SS-TGS-SSGNHGGSGG--GN--GHKPGC</sup>		330
		* * * * *	* * * * *	
マウス	337	NNPGNDVRMAGGSGSQGHGSNGGNIQKEAVNGLNTMNSDASTLPFNIDNFWENLKS <sup>KTRF</sup>		396
ヒト	331	EKPGNEAR---GSG-E---S--G-IQ---NS-ET--S-PG-M-FNFDTFWK <sup>NFKSKLGF</sup>		370
		* * * *	* * * * *	
マウス	397	INWDAINKGHAPSSTRALLYFRKLWENFKRSTPFFNWKQ-IE	GSDLSSLQKRAGGADQF	455
ヒト	371	INWDAINKNQVPPPSTRALLYFSRLWEDFKQNTPFNLWKAIIE	GADASSLQKRA-G----	425
		*****	* * * * *	
マウス	456	SKPEARQDLSADSSKNYYNNQQVNPTYNWQYYTKTTAKAGVTPSSSSASRAQPGLLKWLK		515
ヒト	426	-RAD--QNY-----N-YNQHAYPTAYGGKYSVKTPAKGGVSP-SSSASRVQPGLLQWVK		474
		* * * * *	* * * * *	
マウス	516	FW		517
ヒト	475	FW		476
		**		



[図3-A]

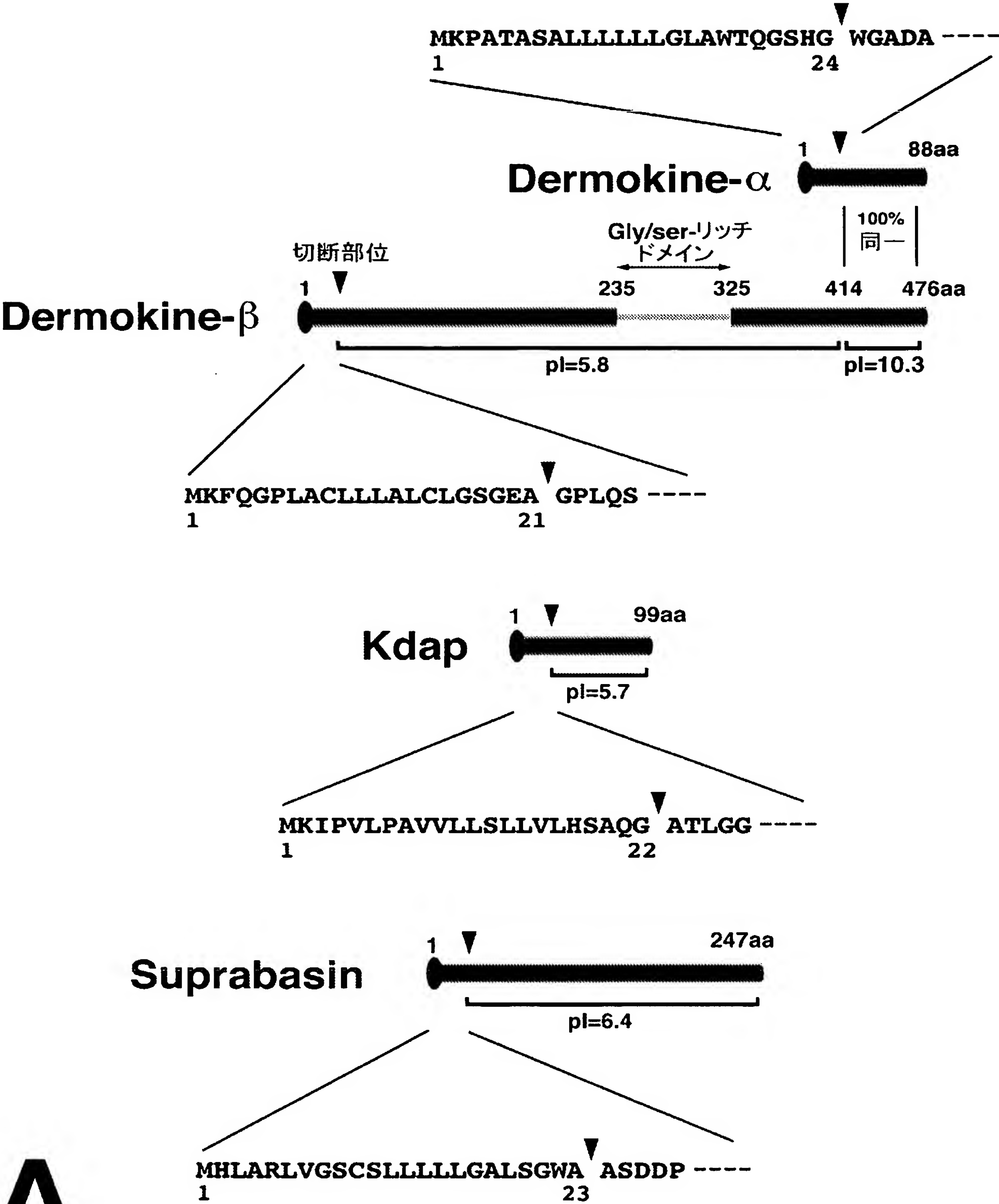


[図3-B]



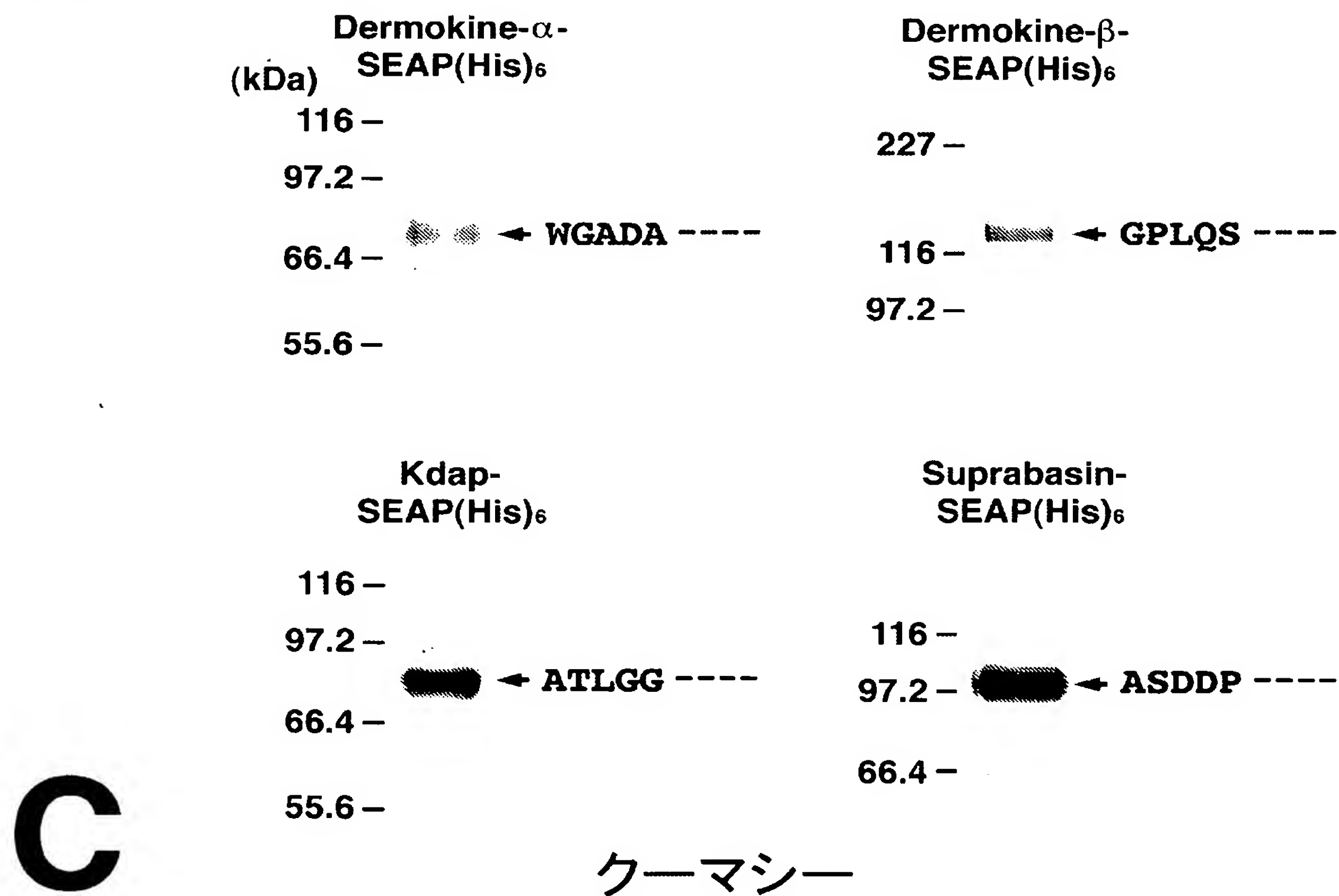
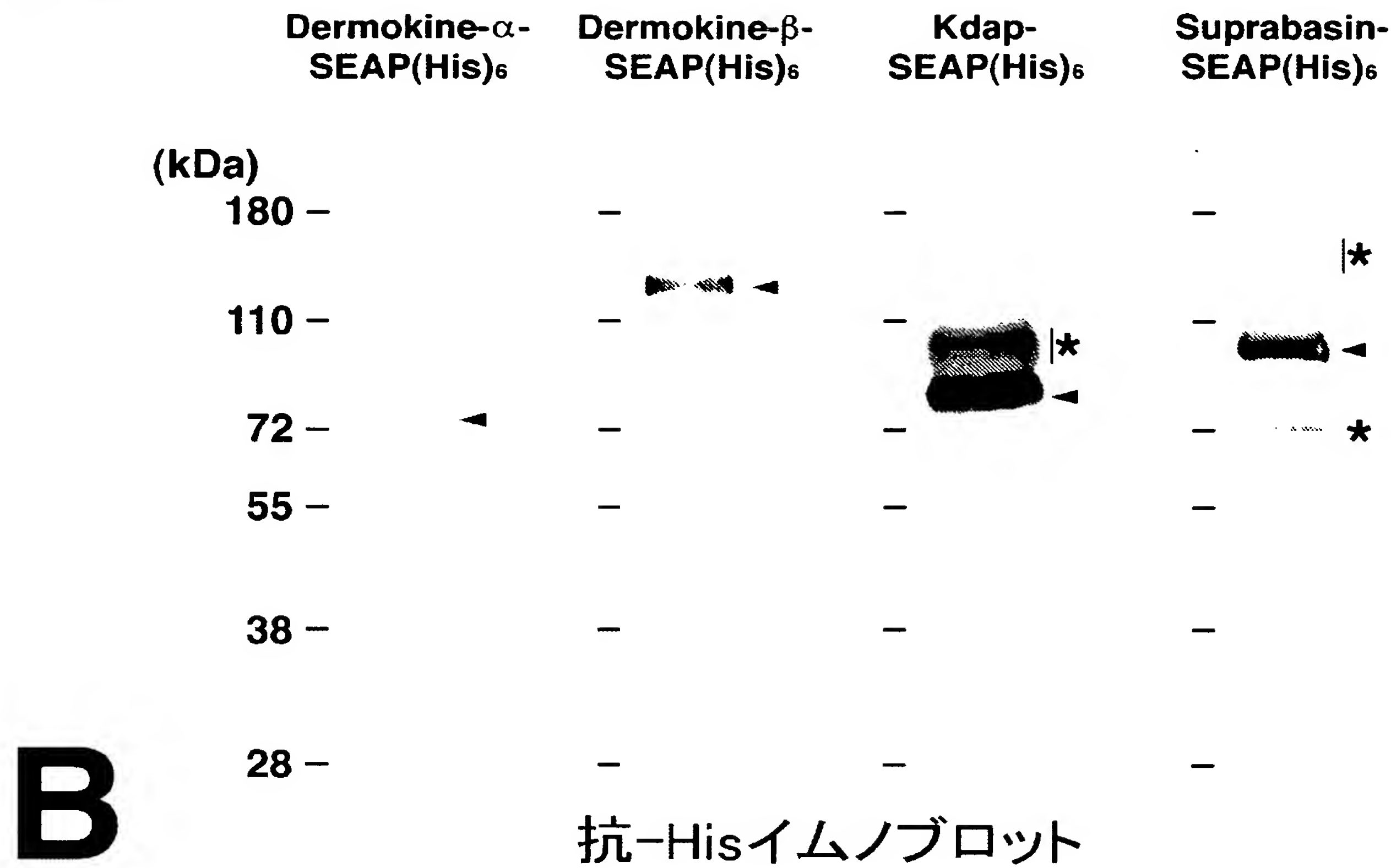
B

[図4-A]



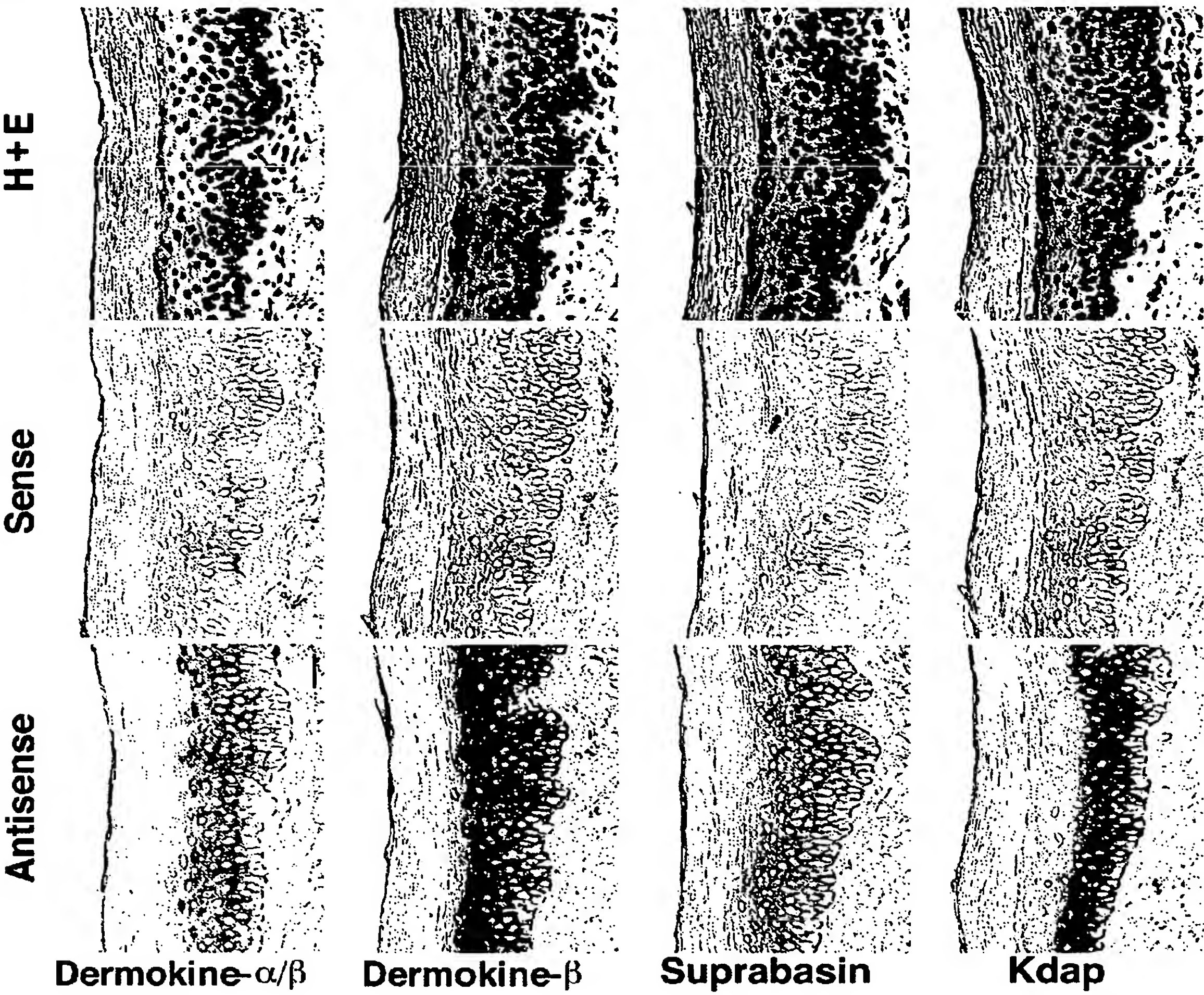
A

[図4-BC]





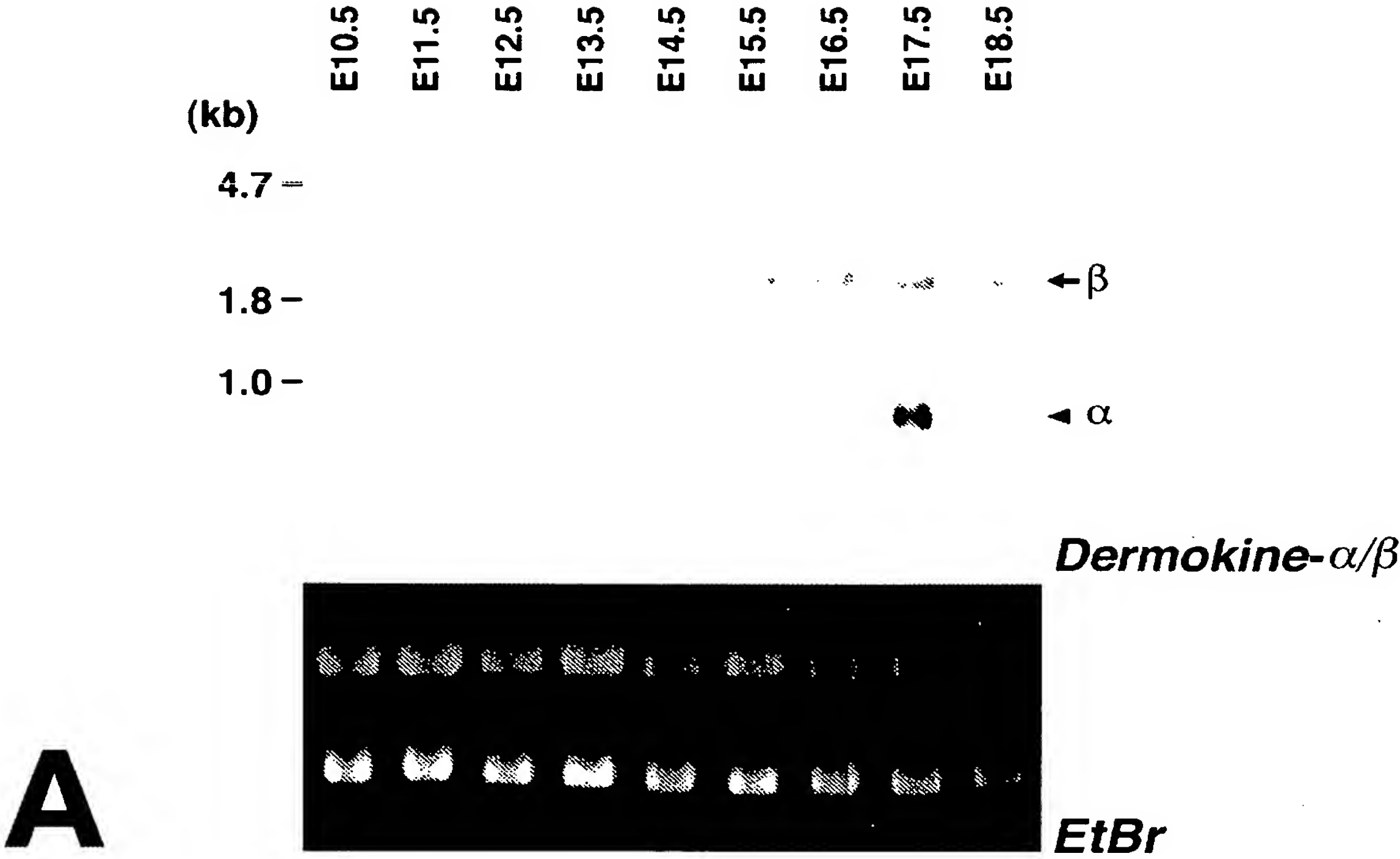
[図5]



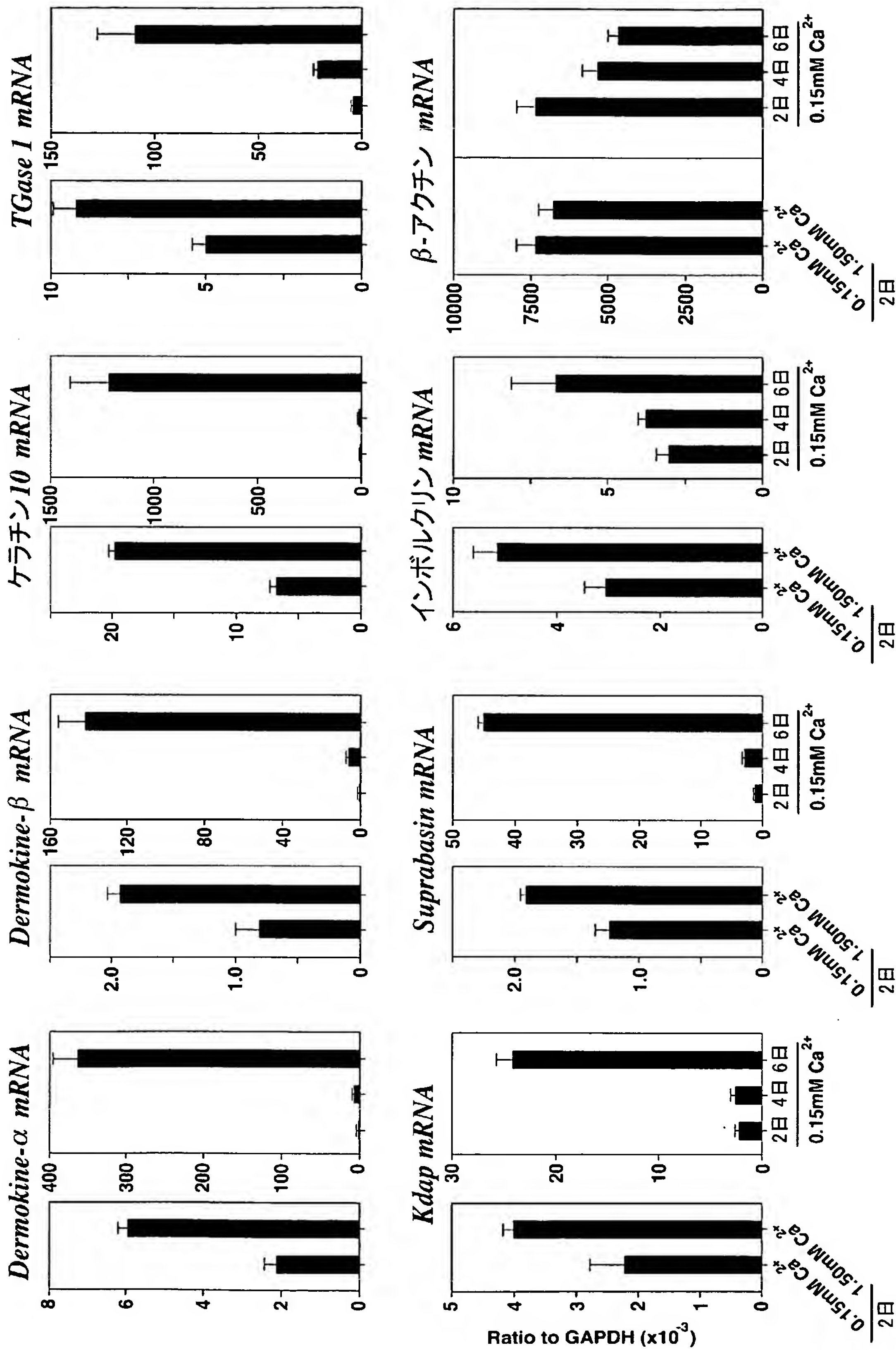
B

A

[図6-A]

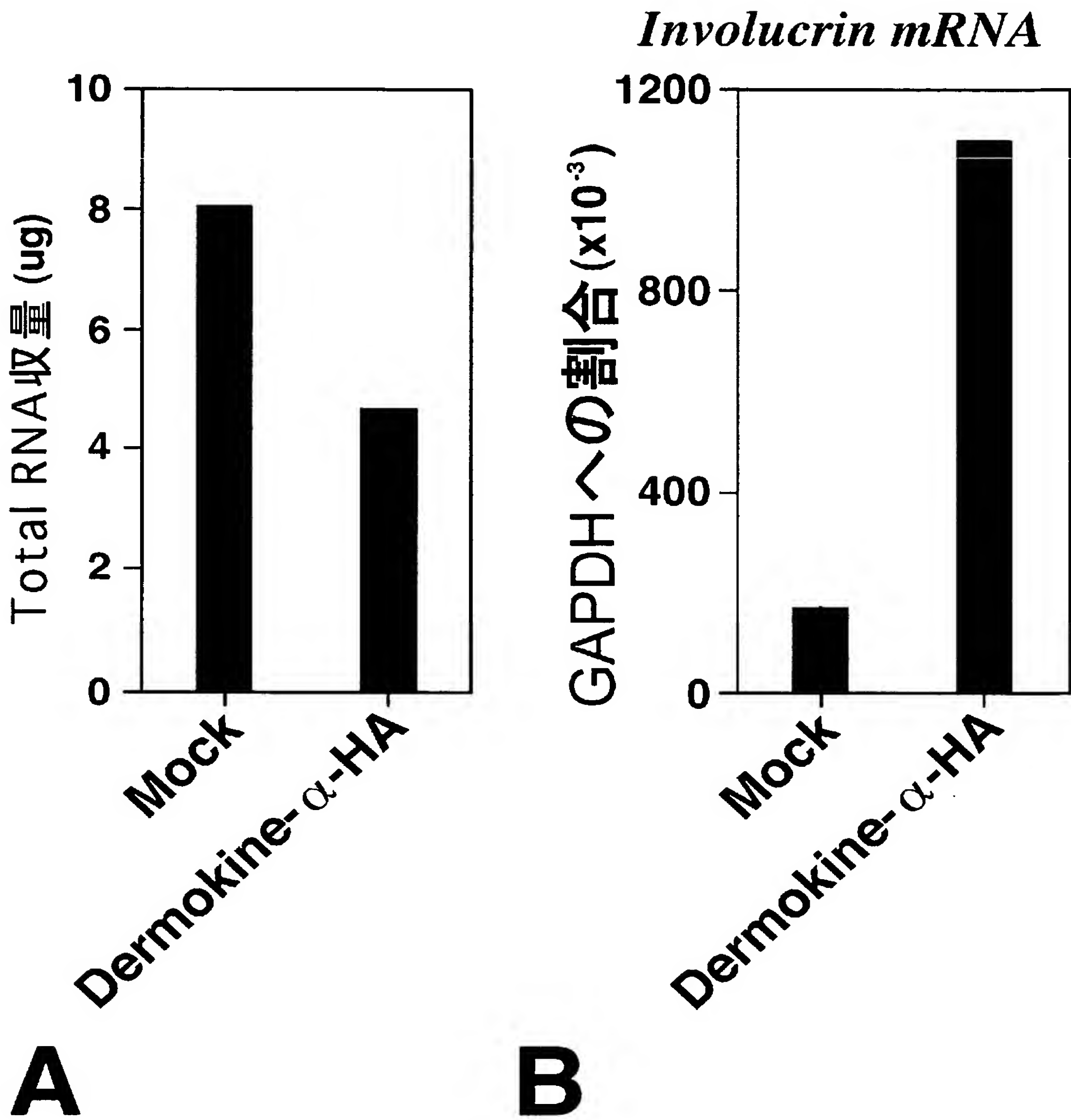


[図6-B]



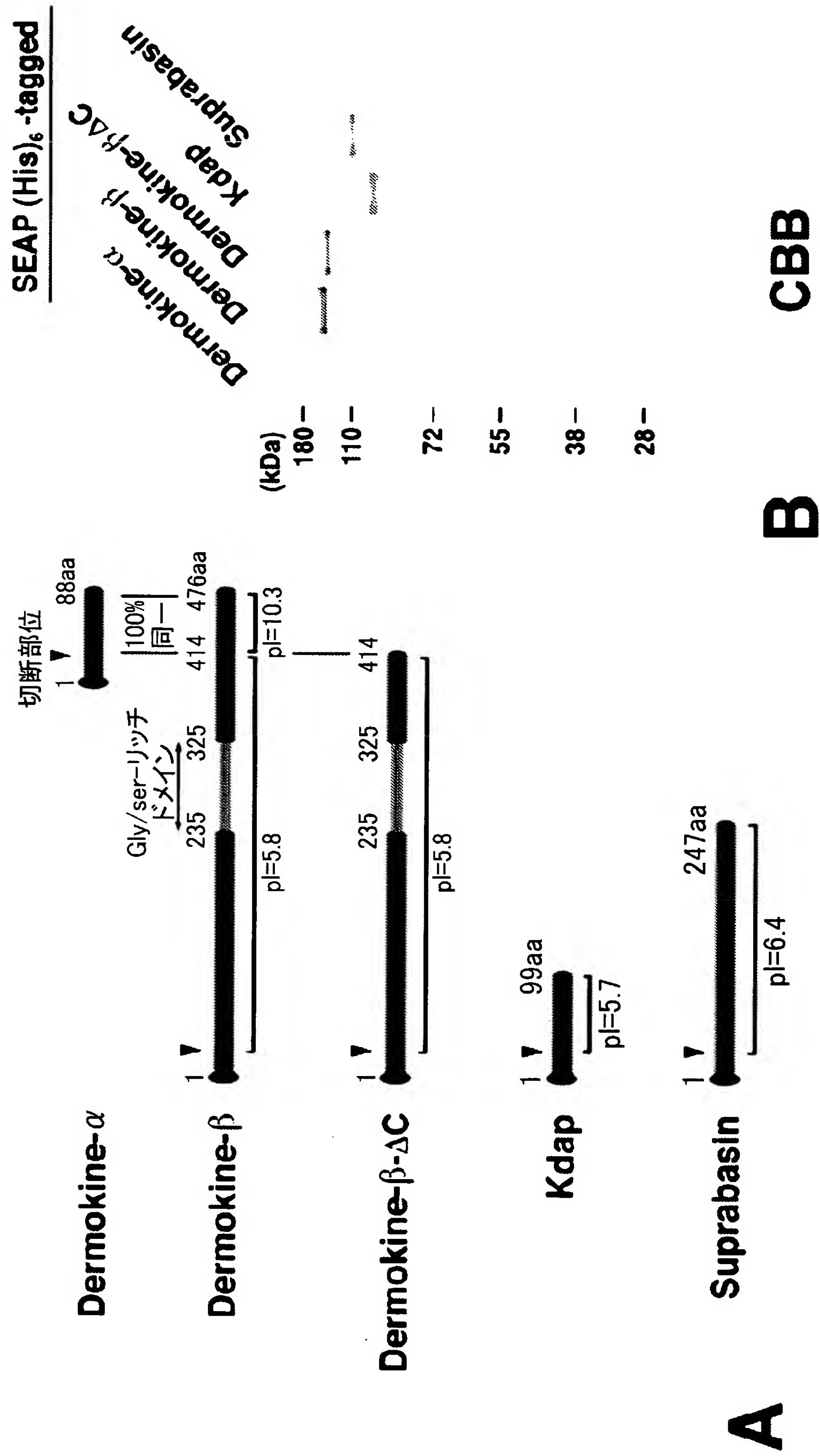
B

[図7]



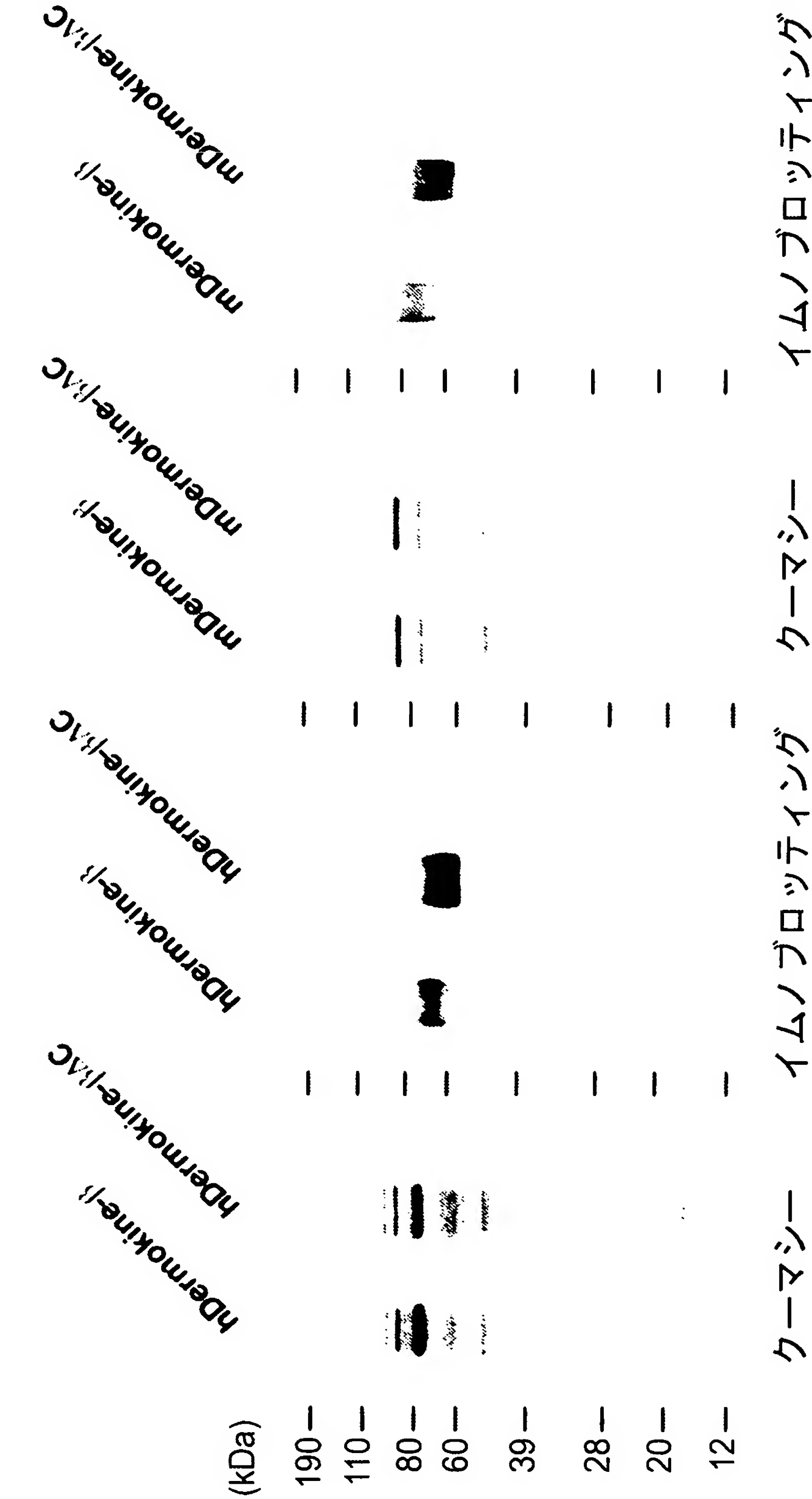


[図8-AB]

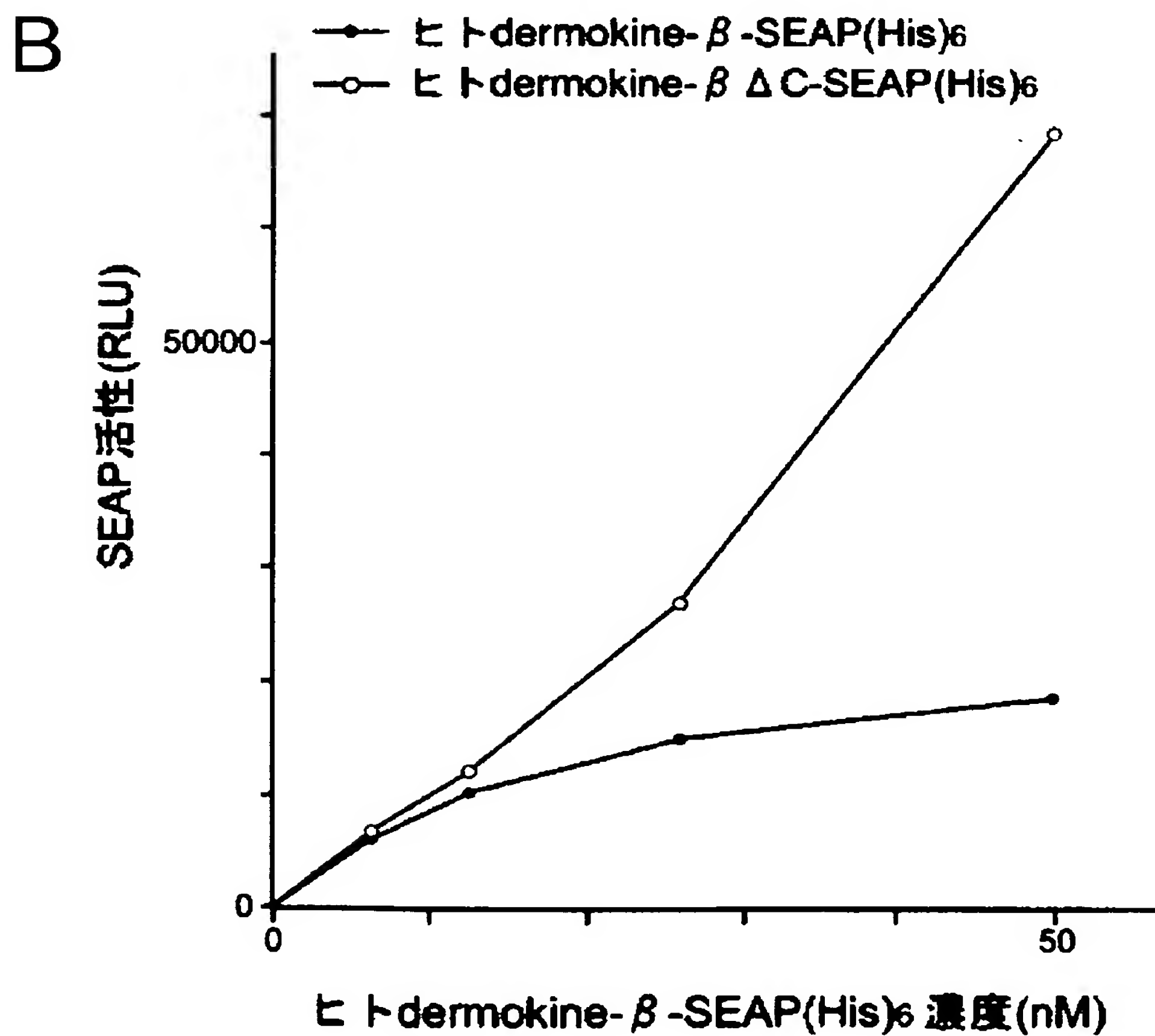
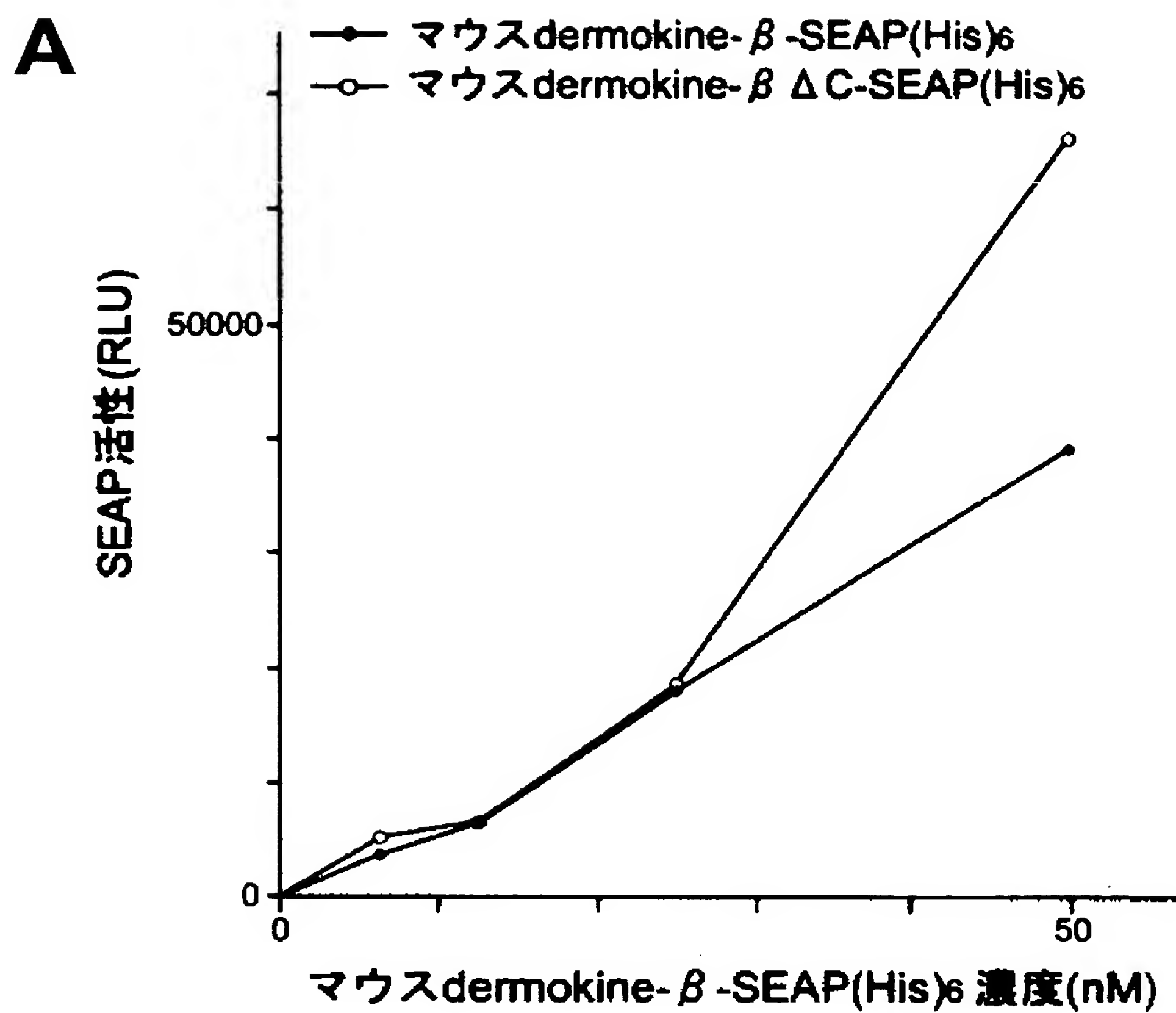




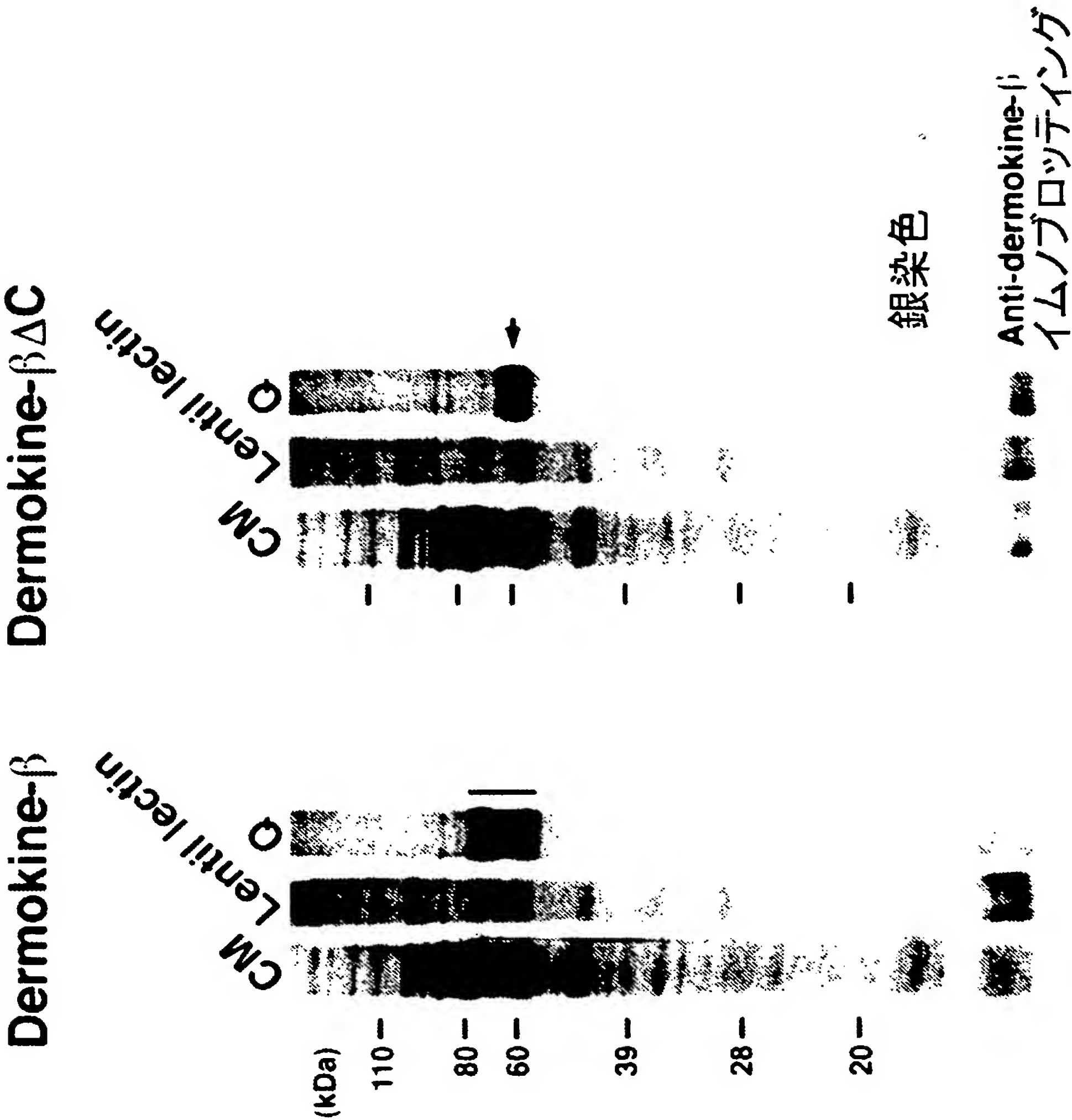
[図9]



[図10]



[図11]





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003458

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, A61K31/7088, 31/7105, 38/00, 39/395, 48/00,  
A61P17/00, 17/06, 17/16, 35/00, C07K14/47, 16/18, C12N1/15,  
1/19, 1/21, 5/10, C12P21/02, C12Q1/02, 1/68, G01N33/15, 33/50, 33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, A61K31/7088, 31/7105, 38/00, 39/395, 48/00,  
A61P17/00, 17/06, 17/16, 35/00, C07K14/47, 16/18, C12N1/15,  
1/19, 1/21, 5/10, C12P21/02, C12Q1/02, 1/68, G01N33/15, 33/50, 33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq/SwissProt/PIR, BIOSIS/MEDLINE/CAPLUS (STN),  
PubMed

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2002/068628 A1 (Human Genome Science, Inc.), 06 September, 2002 (06.09.02), Seq. ID. 45, 123, 193, 271 & EP 1370651 A1	1-6, 8
A	WO 2002/008288 A2 (Genentech, Inc.), 31 January, 2002 (31.01.02), Fig. 156 & EP 1466977 A1 & US 2002/058309 A1	1-6, 8
A	WO 2001/021658 A1 (Human Genome Science, Inc.), 29 March, 2001 (29.03.01), Seq. ID. 92, 178 & US 2002/068319 A1	1-6, 8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
19 April, 2005 (19.04.05)

Date of mailing of the international search report  
17 May, 2005 (17.05.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003458

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PARK Geon Tae et al., Suprabasin, a Novel Epidermal Differentiation Marker and Potential Cornified Envelope Precursor, J.Biol.Chem., Vol.277, No.47, 45195-45202 (2002)	7
A	OOMIZU, Souichi et al., Kdap, a novel gene associated with the stratification of the epithelium, Gene, Vol.256, 19-27 (2000)	7
A	KOMIYA, Tohru et al., A Large-Scale in Situ Hybridization System Using an Equalized cDNA Library, Anal.Biochem., Vol.254, 23-30 (1997)	13-16
P,X	MOFFATT P. et al., Identification of a conserved cluster of skin-specific genes encoding secreted proteins, Gene, Vol,334, 123-131 (2004)	1-16
P,X	MATSUI, Takeshi et al., Identification of novel keratinocyte-secreted peptides dermokine- $\alpha$ / $\beta$ and a new stratified epithelium-secreted protein gene complex human chromosome 19q13.1, Genomics, Vol.84, 384-397 (2004)	1-16

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003458

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 17-20  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 17 to 20 pertain to diagnostic methods to be practiced on the human body or animal body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of the PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/09, A61K31/7088, 31/7105, 38/00, 39/395, 48/00, A61P17/00, 17/06, 17/16, 35/00, C07K14/47, 16/18, C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P21/02, C12Q1/02, 1/68, G01N33/15, 33/50, 33/68

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/09, A61K31/7088, 31/7105, 38/00, 39/395, 48/00, A61P17/00, 17/06, 17/16, 35/00, C07K14/47, 16/18, C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P21/02, C12Q1/02, 1/68, G01N33/15, 33/50, 33/68

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq/SwissProt/PIR、BIOSIS/MEDLINE/CAPLUS (STN)、PubMed

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 2002/068628 A1 (Human Genome Sciences, Inc.) 2002.09.06, SEQ ID 45, 123, 193, 271 & EP 1370651 A1	1-6, 8
A	WO 2002/008288 A2 (Genentech, Inc.) 2002.01.31, FIGURE 156 & EP 1466977 A1 & US 2002/058309 A1	1-6, 8
A	WO 2001/021658 A1 (Human Genome Sciences, Inc.) 2001.03.29, SEQ ID 92, 178 & US 2002/068319 A1	1-6, 8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.04.2005

国際調査報告の発送日

17.5.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

植原 克典

4 B

9840

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	PARK Geon Tae et al. , Suprabasin, a Novel Epidermal Differentiation Marker and Potential Cornified Envelope Precursor, J.Biol.Chem., Vol.277, No.47, 45195-45202(2002)	7
A	OOMIZU Souichi et al., Kdap, a novel gene associated with the stratification of the epithelium, Gene, Vol.256, 19-27(2000)	7
A	KOMIYA Tohru. et al., A Large-Scale in Situ Hybridization System Using an Equalized cDNA Library , Anal. Biochem., Vol.254, 23-30 (1997)	13-16
PX	MOFFATT P. et al., Identification of a conserved cluster of skin-specific genes encoding secreted proteins, Gene, Vol.334, 123-131(2004)	1-16
PX	MATSUI Takeshi. et al., Identification of novel keratinocyte-secreted peptides dermokine- $\alpha$ / $\beta$ and a new stratified epithelium-secreted protein gene complex on human chromosome 19q13.1, Genomics, Vol.84, 384-397(2004)	1-16



## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 17-20 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲 17-20 は人体又は動物の体の診断方法であって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**